Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. H.P.R. Seeliger

ÜBER DIE KOMBINIERTE ANWENDUNG VON TRANSPORT-ANREICHERUNGS- UND SELEKTIVMEDIEN ZUR ANZÜCHTUNG VON LISTERIEN AUS MISCHINFIZIERTEN MATERIALIEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
verfaßt und der Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Edgar Feindt
aus Krefeld

Würzburg, den 12. Juni 1972

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. H.P.R. Seeliger

ÜBER DIE KOMBINIERTE ANWENDUNG VON TRANSPORT-ANREICHERUNGS- UND SELEKTIVMEDIEN ZUR ANZÜCHTUNG VON LISTERIEN AUS MISCHINFIZIERTEN MATERIALIEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
verfaßt und der Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Edgar Feindt
aus Krefeld

Würzburg, den 12. Juni 1972

Referent: Professor Dr. med. H.P.R. Seeliger

Korreferent: Professor Dr. phil. W. Döll

Dekan: Professor Dr. med. K.H. Weis

Tag der mündlichen Prüfung: 14. 7. 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
A.	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
B.	MATERIAL UND METHODIK	6
	I. Material	6
	II. Methodik	8
C.	ERGEBNISSE	19
	1. Quantitative Untersuchungen des Wachstums von L.m. und S. faecalis in 3,75% Kaliumthiocyanat-Tryptose-Bouillon	19
	2. Quantitative Untersuchungen des Wachstums von L.m. und S. faecalis in	20
	a) STUART-Transportmedium und	20
	b) VMG-Transportmedium	21
	3. Semiquantitative Untersuchungen des Verhaltens von L.m. in mit unterschiedlicher Keimzahl künstlich infizierten Stuhlproben bei Aufbewahrung in bzw. ohne STUART-Transportmedium	21
	4. Quantitative Untersuchungen von L.m. in natürlich infiziertem Stuhl mit Hilfe des STUART-Transportmediums	22
	5. Quantitative Untersuchungen von L.m. in natürlich infiziertem Material mit Hilfe des STUART-Transportmediums, des VMG-Transportmediums und eines neuen kombinierten Listeria-Transport-Anreicherungsmediums (modifiziertes STUART-Medium)	23

Seite

6. Quantitative Untersuchungen von L.m. in künstlich infiziertem Stuhl mit Hilfe des neuen Listeria-Transport-Anreicherungsmediums (modifiziertes STUART-Medium) 24

7. Vergleichende Untersuchungen von Stuhlproben mittels unterschiedlicher Transport- und Anreicherungsverfahren unter Anwendung verschiedener fester Nährböden 25

D. DISKUSSION 26

E. ZUSAMMENFASSUNG 39

F. KURVENÜBERSICHT 42

G. LITERATURVERZEICHNIS I

H. REZEPTE V

A. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Seit 1950 wurden allein in Deutschland mehr als 2000 menschliche Listerioseerkrankungen bakteriologisch gesichert (SEELIGER und EMMERLING 1968). Dabei dürfte die tatsächliche Zahl der latent verlaufenden Infektionen ohne klinische Symptome weitaus höher liegen; denn nach wie vor bereitet die Anzüchtung von Listerien besonders aus mischinfiziertem Untersuchungsmaterial, wie z.B. Stuhlproben, große Schwierigkeiten.

Völlige Unklarheit besteht über den Durchseuchungsgrad der Bevölkerung. So isolierten KAMPELMACHER und VAN NOORLE JANSEN (1969) aus Faeces von 342 klinisch gesunden Probanden unterschiedlicher Berufsgruppen 56 mal (16,4%) Listerien. Bei Stuhluntersuchungen von 1150 klinisch gesunden Schlachthofarbeitern in Dänemark fanden BOJSEN-MØLLER und JESSEN (1966) 4,8% Listeria-Träger. In Vaginalabstrichen von 560 Patientinnen einer gynäkologischen Klinik konnten GIRARD und SBARRA (1962) keine Listerien nachweisen. Am hiesigen Institut wurden von 1965 bis Mitte 1969 aus 2873 menschlichen Untersuchungsproben in 24 Fällen (0,87%) positive Listeria-Befunde erhoben (SEELIGER et al. 1970).

Die Schwierigkeiten dieser Untersuchungen liegen vor allem darin, daß die Listeria-Keimzahl in mischinfiziertem Material meistens gering ist und von der Begleitflora rasch überwuchert wird.

Um Untersuchungsproben, in denen Listerien nachgewiesen werden sollen, wenigstens vor physikalischen bzw. chemischen Schädigungen (pH-Verschiebung, Austrocknung, Stoffwechselprodukte) zu schützen, erscheint es ange-

bracht, das Untersuchungsmaterial in einem T r a n s - p o r t m e d i u m an das Labor zu verschicken. Eine möglichst kurze Versanddauer unbehandelter Proben scheint nämlich die positive Ausbeute zu begünstigen (SEELIGER et al. 1970).

Die Wirkung des Transportmediums nach STUART (1959) auf verschiedene Listeria-positive, mischinfizierte Untersuchungsmaterialien wurde von KAMPELMACHER und VAN NOORLE JANSEN (1968) überprüft. Dabei wurde ein gewisser Anreicherungseffekt dieses Mediums gefunden. In einer brieflichen Mitteilung vom 7. 9. 1970 erwähnt KAMPELMACHER sogar eine Steigerung der positiven Ausbeute bei klinisch gesunden Personen bis zu 60 %! Bei Untersuchungen an Reinkulturen von L.m. fanden GÄSTRIN et al. (1968) allerdings im STUART-Medium vom ersten Tag an eine nahezu konstant bleibende Listerienkeimzahl. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen sie mit dem sog. SBL-Medium, einem modifizierten STUART-Transportmedium, wogegen sie die Listerienzahl in einem von MÖLLER (1966, cit. GÄSTRIN et al. 1968) beschriebenen Transportmittel (VMG) nach 5 Tagen beträchtlich erhöht fanden.
Während die Zahl gramnegativer Keime - wie E.coli, Proteus, Klebsiella, Pseudomonas, Salmonella und Shigella - im STUART- und SBL-Medium quantitativ ebenso wie die Listerieneinsaat nahezu unverändert bleiben, zeigt sich im VMG-Medium neben den Listerien eine erhebliche Zunahme auch der Gramnegativen.

Zur Anzüchtung von L.m. aus stark mischinfiziertem Material gilt es, die weitaus massiver vorhandenen Begleitkeime entweder zu reduzieren oder selektiv zu hemmen, wobei die Unterdrückung der Darmstreptokokken (Enterokokken) besondere Schwierigkeiten bereitet. Sie weisen mit den Listerien hinsichtlich ihrer Wachstumsbedürfnisse weitgehende Gemeinsamkeiten auf (SEELIGER 1969).

Unter den allgemein anerkannten Verfahren zur Isolierung von L.m. hat sich besonders die Kälteanreicherung bei + 4° C bewährt (BIESTER und SCHWARTE 1931, GRAY et al. 1948). Sie läßt kulturelle Mehrausbeuten bis 30 %, gelegentlich sogar bis 95 % zu (SEELIGER 1958). Nach GIRARD und SBARRA (1962) ist die Kälteanreicherung in Kombination mit der von GRAY empfohlenen Schrägdurchlichtbetrachtung (HENRY 1933) die z. Zt. wohl empfindlichste Nachweismethode für L.m.. Nachteilig wirkt sich dabei allerdings aus, daß ein positives Ergebnis manchmal erst nach Wochen bis Monate dauernden Aufbewahrungsintervallen erwartet werden kann.

KAMPELMACHER (1969) wies z.B. bei einigen Proben erst nach 30-monatiger Kälteanreicherung Listerien nach. Für die Praxis sind dagegen Verfahren, die eine wesentliche Verkürzung der Isolierungsdauer erlauben, erforderlich, wenn die Befunde eine mehr als retrospektive, epidemiologisch vielleicht bewertbare Aussage erlauben sollen.

Zu diesem Zweck werden verschiedene Substrate, einzeln und in Kombination miteinander, in der Listeria-Diagnostik angewandt. So empfiehlt LEHNERT (1964) zur Vorkultur stark keimhaltigen Materials (z.B. Kotproben, Erde usw.) 3,75 % Kaliumthiocyanat-Bouillon (KSCN) bzw. 0,05 % Kalium-Tellurit-Bouillon (KTB) mit zweitägiger Bebrütungsdauer bei Zimmertemperatur. Diese Medien üben einen hemmenden Effekt auf das Wachstum gramnegativer Keime und aerober Sporenbildner aus, verschonen jedoch die Enterokokken.

Als Selektivmedium zur Isolierung von Listerien empfehlen BEERENS und TAHON-CASTEL (1966) Pferdeblutagar mit Zusatz von 40 µg/ml Nalidixinsäure. Hierdurch wird eine Wachstumshemmung für den größten Teil gramnegativer Keime erzielt. Enterokokken werden leider nicht beeinflußt.

KRAMER und JONES (1969) prüften - wie schon vorher viele andere Autoren - verschiedene Antibiotikazusätze zu Selektivmedien und bestätigten dabei den Wert der Nalidixinsäure. Weiter ermittelten sie eine günstige Wirkung der Kombination von Thalliumacetat (0,02 %) mit Nalidixinsäure (40 und 60 µg/ml) als Zusatz zu festen und flüssigen Basalmedien.

Günstige Isolierungsergebnisse für L.m. aus stark kontaminiertem Material erzielte DESPIERRES (1971) mit einem Medium, das besonders wachstumshemmend auf Streptococcus faecalis wirkt. Es enthält Peptonwasser, Rhamnose, Nalidixinsäure (40 µg/ml), Polymyxin B (3 µg/ml) und Methylenblau.

RALOVICH, FORRAY et al. (1971) verwendeten mit Erfolg Trypaflavin in Kombination mit Nalidixinsäure. BOCKEMÜHL et al. (1971) fanden weitere Acridinfarbstoffe mit selektiver Hemmung von Enterokokken und entwickelten auf dieser Basis in Kombination mit Nalidixinsäure bzw. Kaliumthiocyanat feste Selektivnährböden. Eine praktische Erprobung steht jedoch noch aus. Vorläufige Untersuchungsergebnisse von HÖHNE (1971) weisen darüberhinaus auf die Brauchbarkeit von Acridin-Nalidixinsäure bzw. Acridin-KSCN Kombinationen in flüssigen Anreicherungsmedien hin.

In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragen näher untersucht werden:

1. Läßt sich mit Hilfe des Transportmediums nach STUART bei künstlich und natürlich infizierten Stuhlproben ein Anreicherungseffekt für L.m. nachweisen?

2. Wie verhält sich der Anreicherungseffekt im VMG-Transportmedium im Vergleich zum STUART-Medium?

3. Kann das Wachstum von Enterokokken und gramnegativen Keimen durch kombinierte Anwendung von Transportmedien mit anschließender Anreicherung in Kaliumthiocyanat-Acridin-Bouillon und nachfolgender Aussaat auf festen Acridin-haltigen Nährböden erfolgreich gehemmt bzw. gleichzeitig für L.m. verbessert werden?

4. Bringt die Anwendung dieser Methode im Vergleich zur bisher an diesem Institut gebräuchlichen Verarbeitungsart (2-tätige Bebrütung in KSCN-Bouillon bei Zimmertemperatur und anschließendes fraktioniertes Ausstreichen auf Tryptose-Agar) eine Mehrausbeute von L.m. aus Stuhlproben?

B. MATERIAL UND METHODIK

I. MATERIAL

1. Transportmedien:

Zur Anwendung kamen die folgenden 3 Transportmedien:

a) STUART-Medium (hergestellt aus handelsüblichem Trockensubstrat)

b) VMG (VMG IV)-Medium (MÖLLER 1966, cit. GÄSTRIN et al. 1968)

c) Listeria-Transport-Anreicherungs-(LTA-)Medium
(Modifiziertes STUART-Medium mit Zusatz von Nalidixinsäure (40 µg/ml) und Acridinfarbstoff (10 µg/ml))

2. Farbstoffe:

Die folgenden Acridinfarbstoffe wurden untersucht:

a) Acriflavin neutral (Cassella Nr. 9 100)
(2,8-Diamino-10-methylacridiniumchlorid)

b) Proflavinhemisulfat (Cassella Nr. 9 166)
(2,8-Diaminoacridin-Hemisulfat)

c) Xanthacridin (sowjetischer Herkunft)
(2,8-Diamino-10-methylacridiniumchlorid;
erhalten von Dr. Ralovich)

3. Bakterienstämme:

a) L. monocytogenes

Für die Untersuchungen wurden 6 Listerienstämme verwandt; davon waren 5 aus routinemäßig eingesandtem Untersuchungsmaterial am hiesigen Institut in den letzten 9 Monaten frisch isoliert worden.

L.m. Nr. 245/70 (Typ 4b)
L.m. Nr. 253/70 (Typ 4b)
L.m. Nr. 78/71 (Typ 4b)
L.m. Nr. 71/71 (Typ 1/2 a)
L.m. Nr. 93/71 (Typ 4f)

Bei einem weiteren Stamm, Serotyp 1/2 a, handelte es sich um den Referenzstamm (PATERSON 7973).

b) Streptococcus faecalis

Als weitere Keimart wurden 3 Enterokokkenstämme mit in die Untersuchungen einbezogen:

Nr. S_2 (S. faecalis)
Nr. S_5 (S. faecalis)
Nr. S_{23} (S. faecalis var. liquefaciens)

Die Kulturen waren ebenfalls aus Untersuchungsmaterial isoliert und durch folgende Kriterien als Enterokokken identifiziert worden:

Grampräparat, fehlende Beweglichkeit, fehlende Harnstoffhydrolyse, Vergärung von Glucose, Lactose, Saccharose, Mannitol, Salizin und Aesculin, negative VOGES-PROSKAUER-Reaktion, Reduktion von Methylenblaumilch, Wachstum in 6,5 % NaCl-Bouillon, Gelatineabbau (S_{23}), Hämolyse auf Schafblut-Agar.

4. Klinisches Untersuchungsmaterial

Von Mitte Dezember 1970 bis Ende Juni 1971 wurden 472 Stuhlproben von Schwangeren zweier Würzburger und einer Marburger Frauenklinik auf Listerien untersucht. Mit in die Untersuchungen einbezogen wurden 42 Stuhlproben von Arbeitern des Würzburger Schlachthofes sowie 7 Stuhlproben von Tierpflegern und im Listeria-Labor tätigen Personen des Würzburger Hygieneinstituts.

Sämtliche Stuhlproben wurden parallel in Stuhlröhrchen im Nativzustand ohne Transportmedium sowie in STUART-Transportmedium durch die Post oder durch Boten angeliefert und gelangten 3-10 Tage nach der Entnahme zur Verarbeitung.

II. M E T H O D I K

V o r v e r s u c h e

a) Ermittlung definierter Keimzahlen in NaCl-Verdünnungsreihen

An Hand von Listerien und Enterokokkenreinkulturen in Tryptosephosphat-Bouillon wurde mittels NaCl-Verdünnungsreihen eine gleichbleibende Menge von ca. 10^3 an-

wachsfähigen Keimen/ml durch Ausspateln auf Schafblut-Agar und 24-stündiger Bebrütung bei + 37° C ermittelt. Die Auszählung der angewachsenen Keime erfolgte durch Koloniezählung mit dem elektrischen Zählgerät Placont (BOSCAMP).

b) Quantitative Untersuchung des Wachstums von Listerien und Enterokokken in 3,75 % Kaliumthiocyanat-Tryptose-Bouillon

Zur Untersuchung wurden folgende Stämme herangezogen:

L.m. Nr. 245/70 (Typ 4b)

L.m. Nr. 253/70 (Typ 4b)

L.m. Nr. 7973 (PATERSON, Typ 1/2 a)

Nr. S_2 (S. faecalis)

Nr. S_5 (S. faecalis)

Nr. S_{23} (S. faecalis var. liquefaciens)

Ca. 10^3 Keime suspendiert in 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung wurden in 4,5 ml 3,75 % Kaliumthiocyanat-Tryptose-Bouillon (KSCN) zugegeben. Zur Kontrolle der tatsächlichen Keimzahl wurde innerhalb einer Stunde auf Schafblut-Agar 0,1 ml beimpfte Bouillon ausgespatelt und nach 24-stündiger Bebrütung bei + 37° C die angewachsenen Kolonien ausgezählt.

Die Reagenzgläser mit der beimpften Kaliumthiocyanat-Tryptose-Bouillon wurden bei + 22° C aufbewahrt. Jeweils nach 24 Stunden wurde 0,1 ml der Bouillon auf eine Schafblut-Agar-Platte überpipettiert und ausgespatelt. In gleicher Weise wurden jeweils mehrere Verdünnungsstufen hergestellt und ausgespatelt, um eine zählbare Zahl von Einzelkolonien je Blut-Agar-Platte zu erzielen. Diese wurden 24 Stunden bei + 37° C bebrütet und die angewachsenen Kolonien ausgezählt.

H a u p t v e r s u c h e

1. Quantitative Untersuchung des Wachstums von Listerien und Enterokokken in:

a) STUART- und

b) VMG-Transportmedium

Das Wachstumsverhalten von Listerien und Enterokokken wurde mit folgenden Stämmen untersucht:

L.m. Nr. 245/70 (Typ 4b)
L.m. Nr. 253/70 (Typ 4b)
L.m. Nr. 71/71 (Typ 1/2 a)
L.m. Nr. 7973 (PATERSON, Typ 1/2 a)

Bei Untersuchungen im VMG-Transportmedium wurde anstelle des Referenzstammes Nr. 7973 (PATERSON, Typ 1/2 a), ein frisch isolierter Listerienstamm, Nr. 71/71 (Typ 1/2 a) verwandt.

Nr. S_2 (S. faecalis)
Nr. S_5 (S. faecalis)
Nr. S_{23} (S. faecalis var. liquefaciens)

Aus einer NaCl-Verdünnungsstufe wurden je 0,5 ml in 8 Reagenzgläser mit 4,5 ml STUART- bzw. VMG-Transportmedium verimpft, so daß diese jeweils ca. 10^3 Keime/ml enthielten. Zur Kontrolle wurde 0,1 ml beimpftes Transportmedium auf Schafblut-Agar-Platten ausgespatelt, 24 Stunden bei + 37^0 C bebrütet und die tatsächlich angewachsenen Kolonien ausgezählt.

Die Reagenzgläser mit den beimpften Transportmedien wurden mit Gummistopfen luftdicht verschlossen (um Austrocknung zu vermeiden) und bei Zimmertemperatur gelagert.

Jeweils im Abstand von 24 Stunden wurden, von den beimpften Transportmedien ausgehend, mehrere Verdünnungsstufen hergestellt und davon 0,1 ml auf Schafblut-Agar-Platten ausgespatelt, um eine auszählbare Einzelkolonienzahl pro Platte zu gewährleisten. Die so beimpften Platten wurden vor der Auswertung 24 Stunden bei + 37° C bebrütet. Täglich wurde der pH-Wert der zur Bebrütung gelangten Röhrchen mit den beimpften Transportmedien gemessen.

2. Semiquantitative Untersuchung des Verhaltens von L.m. in mit unterschiedlicher Keimzahl künstlich infizierten Stuhlproben bei Aufbewahrung in bzw. ohne STUART-Medium

Zur Untersuchung wurde der Listeria-Stamm Nr. 245/70 (Typ 4b) benutzt. In 2 Ansätzen wurden frische Stuhlproben mit unterschiedlichen Keimmengen versetzt (1 300, 500 Zellen/ml) und im Homogenisator (SORVALL, Omni-Mixer) bei 6000 U.p.M. mindestens 5 Min. durchmischt. In mehrere Reagenzgläser mit je 3 ml frisch angesetztem STUART-Medium wurden je 2 ml des Listeria-Stuhlgemisches überpipettiert, die Reagenzgläser mit Gummistopfen luftdicht verschlossen und bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Zum Vergleich wurden mehrere Reagenzgläser mit 2 ml Listeria-Stuhlgemisch ohne STUART-Medium luftdicht verschlossen und bei Zimmertemperatur gelagert. Nach Ermittlung eines Ausgangswertes innerhalb der ersten Stunde wurde im Abstand von 1, 2, 3, ... 8 bzw. 20 Tagen je eine kalibrierte Öse (5 mm Durchmesser) mit Material auf

eine Tryptosephosphat-Agar-Platte und Acridin-haltige Selektivnährböden (Acriflavin neutral, Proflavinhemisulfat (10 und 25 µg/ml Konzentration) mit Nalidixinsäure (40 µg/ml Konzentration) fraktioniert ausgestrichen. Die Platten wurden 48 Stunden bei + 37° C bebrütet und anschließend das Kolonienwachstum unter dem Plattenmikroskop bei Schrägdurchlichtbetrachtung abgelesen.

Zusätzlich wurden alle 24 Stunden aus den einzelnen Röhrchen mit und ohne STUART-Medium 0,5 ml in je 2 ml KSCN-Acridinfarbstoff-Bouillon zur selektiven Anreicherung von L.m. überpipettiert und 48 Stunden bei Zimmertemperatur gelagert, danach ebenfalls auf die oben genannten Nährböden fraktioniert ausgestrichen.

Die Identifizierung verdächtiger Kolonien von L.m. erfolgte in allen Versuchen mit Hilfe eines Grampräparates, Nachweis der Beweglichkeit und fehlender Mannitol-Vergärung.

3. Quantitative Untersuchung von L.m. in natürlich infiziertem Stuhl mittels des STUART-Transportmediums

Zur Untersuchung diente eine 4 Wochen alte Kälteanreicherung der Stuhlprobe eines Schlachthofarbeiters in Tryptosephosphat-Bouillon, aus der mit Hilfe des STUART-Mediums Listerien isoliert worden waren (L.m. Nr. 93/71, Typ 4f).

In mehrere Reagenzgläser mit je 1,5 ml STUART-Medium wurden 0,5 ml der positiven in Tryptosephosphat-Bouillon verdünnten Stuhlprobe gegeben und mit Gummistopfen luftdicht verschlossen. Zum Vergleich wurde eine Probe des Anreicherungsmaterials ohne Zusatz eines Präservativmediums angesetzt. Die Reagenzgläser wurden bei Zimmer-

temperatur gelagert und deren Inhalt im Abstand von 24 Stunden untersucht. Die Anzahl der Proben war so bemessen, daß für jede Untersuchung jeweils ein Röhrchen mit und ohne STUART-Medium zur Verfügung standen.

Das mischinfizierte Material ohne Transportmedium wurde zu jedem Verarbeitungstermin zunächst 1:4 verdünnt, um dieselbe Ausgangsverdünnung wie bei den Untersuchungsproben im STUART-Medium zu erhalten. Von dem beimpften Transportmedium wie von dem 1:4 verdünnten Material ohne Transportmedium wurden daran anschließend Verdünnungen von 1:1000 hergestellt und davon 0,1 ml auf Acridin-Nalidixinsäure-haltige Tryptosephosphat-Agar-Platten ausgespatelt.

Zusätzlich wurden alle 24 Stunden aus den einzelnen Reagenzgläsern mit beimpftem STUART-Medium 0,5 ml in 1,5 ml KSCN-Bouillon und KSCN-Acridinfarbstoff-Bouillon überpipettiert und 48 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt; danach ebenfalls auf den Farbstoffnährböden ausgespatelt.

4. Quantitative Untersuchung von L.m. in natürlich infiziertem Material mit Hilfe des STUART-Transportmediums, des VMG-Transportmediums und eines neuen Listeria-Transport-Anreicherungsmediums (modifiziertes STUART-Medium)

Zur Untersuchung diente die Kälteanreicherung (6-Wochen-Anreicherung in Tryptosephosphat-Bouillon bei + 4° C) einer Stuhlprobe, aus der Listerien (Stamm Nr. 78/71, Typ 4b) isoliert worden waren.

In mehrere Reagenzgläser mit je 1,5 ml STUART-Medium, VMG-Medium bzw. modifiziertem STUART-Medium wurden in getrennten Versuchen 0,5 ml der positiven, in Tryptosephosphat-Bouillon verdünnten Stuhlprobe gegeben und mit Gummistopfen luftdicht verschlossen. Zum Vergleich wurde eine Probe des Anreicherungsmaterials ohne Zusatz eines Präservativmediums angesetzt. Die Reagenzgläser wurden bei Zimmertemperatur gelagert und deren Inhalt im Abstand von 24 Stunden untersucht. Die Anzahl der Proben war so bemessen, daß für jede Untersuchung jeweils ein Röhrchen mit den verschiedenen beimpften Medien zur Verfügung stand.

Das mischinfizierte Material ohne Transportmedien wurde zu jedem Verarbeitungstermin zunächst 1:4 verdünnt, um dieselbe Ausgangsverdünnung wie bei den Untersuchungsproben in den einzelnen Transportmedien zu erhalten. Von den beimpften Transportmedien wie von dem 1:4 verdünnten Material ohne Transportmedium wurden daran anschließend Verdünnungen von 1:1000 hergestellt und davon 0,1 ml auf die oben beschriebenen Acridin-Nalidixinsäure-haltigen Tryptosephosphat-Agar-Platten ausgespatelt. Nach 48 Stunden Bebrütung der Platten bei + 37° C erfolgte die Identifizierung der angewachsenen L.m.-Kolonien.

Zusätzlich wurden alle 24 Stunden aus den einzelnen Reagenzgläsern mit beimpftem STUART- und VMG-Medium 0,5 ml in 1,5 ml KSCN-Acridinfarbstoff-Bouillon zur selektiven Anreicherung für L.m. überpipettiert und 48 Stunden bei Zimmertemperatur bebrütet; danach ebenfalls auf den Farbstoffnährböden ausgespatelt.

5. Quantitative Untersuchung von L.m. in künstlich infiziertem Stuhl mit Hilfe des neuen Listeria-Transport-Anreicherungsmediums (modifiziertes STUART-Medium)

Folgende Stämme wurden zur Untersuchung benutzt:

L.m. Nr. 245/70 (Typ 4b)

L.m. Nr. 78/71 (Typ 1/2 a)

L.m. Nr. 71/71 (Typ 1/2 a)

L.m. Nr. 253/70 (Typ 4b)

10 g Stuhl wurden mit 10 ml Listeria-Suspension, in der ca. 250-1200 Keime/ml enthalten waren, homogenisiert.

In mehrere Reagenzgläser mit je 3 ml frisch angesetztem L.m.-Transport-Anreicherungsmedium wurden je 1 ml des Listeria-Stuhlgemisches eingefüllt (Zellzahl des 1:4 verdünnten Gemisches ca. 30-150/ml), die Reagenzgläser mit Gummistopfen luftdicht verschlossen und bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Nach Ermittlung des jeweiligen Ausgangswertes innerhalb der ersten Stunde wurde im Abstand von 1, 2, 3, ... 14 Tagen je ein Reagenzglas mit dem beimpften Transportmedium weiterverdünnt und von mehreren Verdünnungsstufen jeweils 0,1 ml auf Acridin-haltige Nähragarplatten ausgespatelt, um eine auszählbare Zahl von Kolonien zu erhalten. Die Platten wurden 48 Stunden bei + 37° C bebrütet und dann die angewachsenen L.m. ausgezählt.

6. Vergleichende Untersuchungen von Stuhlproben mittels unterschiedlicher Transport- und Anreicherungsverfahren unter Anwendung verschiedener fester Nährböden

Bisher wurde die Untersuchung von Stuhlproben in der Routine des Listeria-Laboratoriums in folgender Weise durchgeführt:

Anlieferung der Stuhlproben ohne Transportmedium ——→ Direktaussaat auf Schafblut-Agar- und Tryptose-Agar-Platten ——→ Bebrütung beider Nährböden 24 Stunden bei + 37° C.

Die genaue Identifizierung Listeria-verdächtiger Kolonien erfolgte unter dem Plattenmikroskop bei Schrägdurchlichtbetrachtung (Tryptose-Agar-Platte), Anfertigung eines Grampräparates und mittels der "Bunten Reihe" (Beweglichkeit, Harnstoff, Glucose, Lactose, Saccharose, Mannitol, Salizin, Aesculin, positive VOGES-PROSKAUER-Reaktion, Hämolyse auf Schafblutagar).

Anreicherung:

Eine Öse voll Untersuchungsmaterial wurde in ca. 5 ml Kaliumthiocyanat-Bouillon verimpft und 48 Stunden bei Zimmertemperatur gehalten.

Von derselben Probe wurde eine Öse voll in ca. 5 ml Tryptosephosphat-Bouillon verimpft und 6 Wochen bei + 4° C aufbewahrt (sog. 1. Kälteanreicherung). Danach erfolgte Ausimpfen auf die oben beschriebenen Agarplatten und weitere 6-monatige Lagerung der beimpften Bouillon bei + 4° C (sog. 2. Kälteanreicherung).

Seit Dezember 1970 wurde das STUART-Medium in den Gang der Untersuchungen von Stuhlproben zweier Frauenkliniken aufgenommen.

Von Februar 1971 wurden Stuhlproben einer dritten Frauenklinik ebenfalls nach dem veränderten Schema in die Untersuchungen einbezogen.

Zur Verarbeitung kamen bis Ende Juni 1971 insgesamt 472 Stuhlproben, wovon 392 im STUART-Medium und seit Anfang Juni 1971, 80 Proben im neuen Listeria-Transport-Anreicherungs-(LTA-)Medium aus den drei genannten Kliniken angeliefert worden waren.

Bis Mitte April 1971 wurde das Untersuchungsmaterial (257 Proben) nur auf Tryptose-Agar-Platten ausgesät. (Die Verarbeitung auf Schafblut-Agar-Platten war schon zu Beginn 1971 eingestellt worden.) Seit Mitte April 1971 wurde das Material auf Acridin-(10 µg/ml) und Nalidixinsäure-haltigen (40 µg/ml) Tryptose-Agar-Platten ausgestrichen. Zusätzlich wurden die Tryptose-Agar-Platten noch bis Untersuchungsende zur Kontrolle mit herangezogen.

Einsendetechnik:

Sterile Plastikröhrchen wurden mit frischem STUART-Medium (13 ml) zu 4/5 gefüllt und, entsprechend den Bestimmungen in Blechhülsen sowie Holzkästchen verpackt, zusammen mit einem leeren Stuhlröhrchen an die Empfänger versandt. Eine etwa erbs- bis kirschgroße Stuhlprobe wurde mit einem im Stopfen des Röhrchens angebrachten Löffel in das Gläschen mit und ohne STUART-Medium gefüllt.

Die Proben trafen zwischen 2 und 8 Tagen im Laboratorium ein und wurden 3 bis 10 Tage nach dem Entnahmezeitpunkt entsprechend dem oben genannten Schema verarbeitet. Die Kälteanreicherung (nach 6 Wochen und 6 Monaten) wurde beibehalten.

In gleicher Weise wurden 42 Stuhlproben von Arbeitern des Würzburger Schlachthofes und von 7 Angestellten des hiesigen Instituts verarbeitet.

Zusätzlich zur 48-Stunden-Anreicherung in Kaliumthiocyanat wurde für die Listeria-Stuhluntersuchungen der Schlachthofarbeiter, der Angestellten des hiesigen Instituts und ab Mitte April 1971 bei Schwangeren der drei Frauenkliniken Acridin-haltige Kaliumthiocyanat-Bouillon gewählt (insgesamt 264 Proben).

C. E R G E B N I S S E

1. Quantitative Untersuchungen des Wachstums von Listerien und Enterokokken in 3,75 % Kaliumthiocyanat-Tryptose-Bouillon

Die Wachstumsergebnisse von 3 Listerien- und 3 Enterokokkenstämmen während einer Versuchsdauer von 8 bzw. 14 Tagen bei + 22° C sind in Abb. 1 und 2 zusammengefaßt.

Danach zeigt die Wachstumskurve des Listeria-Stammes Nr. 253/70 Typ 4b bei + 22° C einen starken Anstieg innerhalb der ersten 24 Stunden. Bei den Stämmen Nr. 245/70 Typ 4b und Nr. 7973 (PATERSON) Typ 1/2 a erfolgt der Anstieg der Keimzahl unter Wachstumsbedingungen bei Zimmertemperatur erst am 3. Tag. Für alle 3 Stämme bleibt die Keimzahl nach Erreichen des Maximalwertes über mehrere Tage auf dem gleichen Niveau.

Bei + 37° C Bebrütungstemperatur nimmt die Keimzahl (in Abb. 1 kurvenmäßig nicht erfaßt) sofort stark zu und erreicht die stationäre Phase nach 24 Stunden, um nach weiteren 24 Stunden allmählich wieder abzufallen.

Das Wachstum der 3 Listeria-Stämme in 3,75 % KSCN-Bouillon bei + 4° C (kurvenmäßig nicht erfaßt) zeigt während der gesamten Versuchsdauer keine Vermehrung.

Die Wachstumskurven der 3 Enterokokkenstämme (Abb. 2) bei + 22° C steigen steil an, ebenso die nicht kurvenmäßig erfaßten Werte bei + 37° C. Ihr Maximalwert ist für + 37° C nach 24 Stunden, bei + 22° C nach 4-5 Tagen erreicht. Bei + 4° C ist nahezu über die gesamte

Versuchsdauer keine Änderung der Keimzahl zu beobachten; erst gegen Ende des Versuchs senkt sich die Keimzahl etwas (kurvenmäßig nicht erfaßt).

Der pH-Wert des Versuchsmaterials lag während der gesamten Versuchsdauer am Neutralpunkt.

2. Quantitative Untersuchungen des Wachstums von Listerien und Enterokokken in:

a) STUART-Medium und

b) VMG-Transportmedium

a) STUART-Medium

Bei Einsaat von 1200 - 1800 Zellen/ml (Abb. 3) zeigen 2 Listeria-Stämme eine Vermehrung der Keimzahl um 3 Log. innerhalb des 1. Tages. Danach kommt es zu keiner wesentlichen Vermehrung mehr; die Keimzahl hält sich auf einem gleichbleibenden Wert bis zum Ende des Versuchs. L.m.-Stamm Nr. 7973 (PATERSON) Typ 1/2 a, ein alter Referenzstamm, zeigt einen weniger typischen Kurvenverlauf und erreicht seinen Maximalwert erst nach 3 Tagen. Die Einsaatmenge bei 3 Enterokokkenstämmen lag zwischen 150 - 180 Keimen/ml.

Abb. 4 zeigt am 1. Tag einen steilen Anstieg um etwa 3 Log., wobei die höchste Keimzahl während des 2. - 3. Tages erreicht ist. Die Wachstumskurve für die 3 Enterokokkenstämme verläuft dann bis zum letzten Versuchstag nahezu konstant.

Diese Versuche wurden bei + 22° C durchgeführt. Tägliche pH-Wert-Messungen lagen konstant bei 6,9.

b) VMG-Medium

Die Keimeinsaat von 3 Listeria-Stämmen lag zwischen 500-800 Zellen/ml. Die Wachstumskurven für alle 3 Stämme (Abb. 5) zeigen den stärksten Anstieg während des 1., um während des 2. und 3. Versuchstages nur noch geringfügig anzusteigen. Die Keimzahlen bleiben bis zum 8. Versuchstag konstant.

Bei den Enterokokkenstämmen lag die eingeimpfte Keimmenge zwischen 100-200 Zellen/ml. Auch hier zeigen die Wachstumskurven (Abb. 6) den stärksten Anstieg am 1. Versuchstag, während am 2. und 3. die Kurve nur noch geringfügig ansteigt und danach konstant verläuft.

Der pH-Wert während des gesamten Versuchs, der bei + 22° C durchgeführt wurde, lag bei 6,6.

Vergleicht man die Wachstumskurven der Listerien und Enterokokken im STUART- und VMG-Transportmedium, so kommt es im VMG-Medium sowohl für Listerien wie für Enterokokken zu einer stärkeren Vermehrung (um fast 2 Log.) trotz niedrigerer Keimeinsaat.

3. Semiquantitative Untersuchung des Verhaltens von L.m. in mit unterschiedlicher Keimzahl künstlich infizierten Stuhlproben bei Aufbewahrung in bzw. ohne STUART-Medium

Das Verhalten der Listeria-Keimzahl (L.m. Nr. 245/70 Typ 4b) in künstlich infizierten Stühlen bei Aufbewahrung im STUART-Medium bzw. ohne Präservativmedium bei Zimmertemperatur ist in Abb. 7 dargestellt. Die eingeimpfte Keimzahl lag bei 1300/ml. Isolierung und semi-

quantitative Auswertung erfolgte in KSCN-Acridin-Bouillon und anschließendem fraktioniertem Ausstreichen auf Acridin-Tryptose-Nährböden.

Aus Abb. 7 ist eine deutliche Zunahme der Keimzahl bis zum 3.-5. Tag aus im STUART-Medium gelagerten Proben ersichtlich. Die Identifizierung von L.m. nach Aussaat auf verschiedenen Nährböden gelang, wie in Abb. 7 dargestellt, am besten von Acriflavin neutral –haltigen Nährböden. Ferner ist ersichtlich, daß die auf Tryptosephosphat-Agar gewonnenen Keimzahlen am niedrigsten lagen; desgleichen waren Keimzahlen, die von Stuhlproben ohne vorherige Lagerung in STUART-Medium gewonnen wurden, viel niedriger.

Tägliche pH-Wert-Messungen der Stuhlproben ergaben Werte von 6,9, die in der zweiten Versuchshälfte auf 7,2 anstiegen.

Abb. 8 zeigt die Anwachsrate für L.m. Nr. 245/70 Typ 4b in künstlich infiziertem Stuhl bei Aufbewahrung in und ohne STUART-Medium während eines 20-tägigen Versuchs. Die eingeimpfte Keimzahl lag bei 500/ml. Die Stuhlproben wurden ohne flüssige Vorkultur direkt auf feste Nährböden ausgestrichen. Hier wird eine deutliche Vermehrung der Listeria-Keimzahl bei den im STUART-Medium aufbewahrten Stuhlproben zwischen dem 7. und 12. Tag sichtbar.

4. Quantitative Untersuchungen von L.m. in natürlich infiziertem Stuhl mit Hilfe des STUART-Transportmediums

Die Abb. 9 - 10 fassen die Ergebnisse eines 15-tägigen Versuches mit natürlich infiziertem Stuhlmaterial eines Schlachthofarbeiters zusammen, aus dem unter Verwendung des STUART-Mediums L.m. Nr. 93/71 Typ 4f isoliert worden war.

Aus den zugehörigen Kurven ist ersichtlich:

a) Bei gleicher Vorkultur und weiterer Aussaat auf feste Nährböden liegen Keimzahlen, die nach Aufbewahrung in STUART-Medium ermittelt wurden, etwa 10 mal höher als nach Aufbewahrung ohne Transportmedium.

b) Die flüssige Vorkultur in KSCN-Bouillon bzw. Acridin-KSCN-Bouillon führt im Prinzip zu gleichen Ergebnissen.

c) Material ohne flüssige Vorkultur zeigt durchschnittlich ein geringeres Keimwachstum.

d) Aussaat auf Acriflavin neutral-haltigem Nähragar mit 10 µg/ml führt durchschnittlich zu etwas höherer Keimanwachsrate als bei einer Konzentration von 25 µg/ml.

5. Quantitative Untersuchungen von L.m. in natürlich infiziertem Material mit Hilfe des STUART-Transportmediums, des VMG-Transportmediums und eines neuen kombinierten Listeria-Transport-Anreicherungsmediums (modifiziertes STUART-Medium)

Die Abb. 11 - 14 zeigen die Wachstumskurven für L.m. Nr. 78/71 Typ 4b in natürlichem Keimmaterial nach Lagerung im Listeria-Transport-Anreicherungsmedium (LTA-Medium), STUART-Medium und VMG-Medium ohne Anreicherung und nach Ausspateln auf 10 bzw. 25 µg/ml Acriflavin neutral- und Proflavinhemisulfat-haltigen Selektivnährböden. Außerdem sind die Ergebnisse mittels der gleichen Nährböden wiedergegeben, wenn beim Gebrauch des STUART- und VMG-Mediums eine 2-tägige Anreicherung in Acridin-haltiger KSCN-Bouillon zwischengeschaltet wurde.

Im LTA-Medium wird eine deutliche Keimvermehrung bis etwa zum 5. Versuchstag sichtbar. Danach kommt es zu keiner Steigerung der Keimzahl mehr. Demgegenüber ist die Keimvermehrung im STUART- und VMG-Transportmedium bei weitem nicht so ausgeprägt.

Bei Verwendung Acridin-haltiger KSCN-Bouillon als 2-Tage-Anreicherungsmedium bei Zimmertemperatur zeigt sich eine recht deutliche Nivellierung der Keimzahlen sowohl für das STUART-Medium wie für das VMG-Medium. Zwar kommt es allgemein zum Maximalanstieg der Keimzahl am ersten Versuchstag, doch liegt sie bei Verwendung des LTA-Mediums ohne nachfolgende Anreicherung in Acridin-haltiger KSCN-Bouillon etwa vom 5. Versuchstag an darüber.

Der pH-Wert des bei Zimmertemperatur durchgeführten Versuchs lag bei 6,9.

6. Quantitative Untersuchung von L.m. in künstlich infiziertem Stuhl mit Hilfe des neuen Listeria-Transport-Anreicherungsmediums(modifiziertes STUART-Medium)

Die Abb. 15 - 17 geben das Wachstum von 3 Listeria-Stämmen im neuen Listeria-Transport-Anreicherungs-(LTA)-Medium nach Aussaat auf Acridin-haltige Selektivnährböden (10 µg/ml bzw. 25 µg/ml) wieder.

Die Kurven zeigen übereinstimmend einen deutlichen Anstieg der Listeria-Keimzahlen, deren Maximalwert um den 6. bis 7. Versuchstag liegt. Nach Einsaaten von ungefähr 30, 70 bzw. 150 Zellen/ml vermehren sich die Keimzahlen um 3 - 5 Log.

7. Vergleichende Untersuchungen von Stuhlproben mittels unterschiedlicher Transport- und Anreicherungsverfahren unter Anwendung verschiedener fester Nährböden

Von Dezember 1970 bis Ende Juni 1971 wurden 521 Stuhlproben nach den neuen Verfahren verarbeitet und damit aus 6 Proben (1,15 %) Listerien isoliert.

Aus 42 Stuhlproben von Arbeitern des Würzburger Schlachthofs fanden sich 2 mal Listerien (L.m. 96/71 Typ 4d und L.m. 93/71 Typ 4f). Ihre Darstellung gelang nach 2-tägiger Anreicherung in Xanthacridin-haltiger KSCN-Bouillon und anschließendem Ausstreichen auf Acridin-haltigen Tryptose-Agar und reinen Tryptose-Agar.

Dabei wuchsen Listeria-Kolonien gehäuft auf farbstoffhaltigem Nähragar von Material, das vorher in STUART-Medium gelagert war. Auf Tryptose-Agar-Platten wuchsen hingegen L.m.-Kolonien nur ganz vereinzelt.

Aus 472 Stuhlproben der 3 genannten Frauenkliniken ließen sich 4 mal Listerien (L.m. Nr. 78/71 Typ 4b, L.m. Nr. 104/71 Typ 4b, L.m. Nr. 105 Typ 4 Ag.-Formel VI, VII, X, XI) isolieren. Eine Probe (L.m. Nr. 71/71 Typ 1/2 a) wurde erst nach 6-wöchiger Kälteanreicherung positiv, wobei auf den Selektivnährböden aus ursprünglich in STUART-Medium gelagertem Material etwa doppelt soviel L.m.-Kolonien isoliert werden konnten wie aus Material, das nicht in STUART-Medium gehalten worden war. In den 3 anderen Fällen wurden die Proben nach 2-tägiger Anreicherung in Xanthacridinhaltiger KSCN-Bouillon positiv. Auch hier ließen sich dabei Listerien massiv aus Material isolieren, welches vorher in STUART-Medium gelagert worden war, gegenüber nur vereinzelten Kolonien aus Stuhlproben ohne STUART-Medium.

D. D I S K U S S I O N

Die Anzüchtung von L.m. aus stark mischinfizierten Untersuchungsmaterialien, wie Stuhlproben, Erdproben oder Abwasser, bereitet im Gegensatz zur Isolierung aus normalerweise keimfreiem Material, wie z.B. Liquor oder Mekonium, häufig Schwierigkeiten. So finden sich im Stuhl Listeria-Infizierter meist nur sehr selten nennenswerte Listeria-Keimzahlen. Darüberhinaus verhalten sich die weitaus zahlreicheren Darmstreptokokken kulturell sehr ähnlich wie die Listerien (SEELIGER 1969) und überwuchern diese leicht.

Die Bildung antibiotisch wirksamer Substanzen durch andere Mikroorganismen (vor allem der Gattungen Streptococcus, Pseudomonas, Bacillus u. a.) könnte, wie ERREBO LARSEN (1966) gezeigt hat, einen wachstumshemmenden Einfluß auf Listerien ausüben. ERREBO LARSEN (1969) untersuchte frische, mit Listerien beimpfte Stuhlproben verschiedener Tierspezies auf das Vorhandensein antibiotisch wirksamer Substanzen und kam zu dem Schluß, daß antibiotische Prinzipien auch in Mischkulturen wie frischem Stuhl vorhanden sind. Wurden die Stuhlproben 24 Stunden bei + 26° C bebrütet, zeigte sich eine starke Abschwächung der Hemmwirkung; das Wachstum von L.m. wurde dabei nicht behindert. Ebenso ist damit zu rechnen, daß Stoffwechselprodukte des Wirtsorganismus eine Schädigung der Listerien verursachen (ERREBO LARSEN 1969). Nach BARON (1950) sind Antibiotika Metaboliten, die einen antagonistischen Effekt auf das Wachstum oder Überleben von Mikroorganismen ausüben und in geringen Konzentrationen wirksam sind. Antibiotisch wirksame Substanzen des Makroorganismus wären in eine solche Definition eines Antibiotikums mit eingeschlossen.

Eine Sonderstellung in der mikrobiellen Antibiose nehmen die sog. Bakteriocine ein. Sie töten Zellen artverwandter Bakterienkulturen ab. Auch einige Listeria-Stämme bilden Bakteriocine (sog. Monocine) und hemmen sich so in ihrem Wachstum möglicherweise selbst (HAMON und PÉRON 1962, 1963).

Als weiteren wachstumshemmenden Faktor für L.m. nimmt ANDERSON (1957) einen antagonistischen Bakteriophageneffekt an. SWORD und PICKETT (1957, cit. SEELIGER 1958) haben überdies bei Listerien Lysogenie festgestellt. Mit Sicherheit vermögen manche Staphylococcus aureus-Phagen Listerien zu lysieren (SWORD 1957, cit. SEELIGER 1958).

Von großer Bedeutung für das Wachstum von Listerien sind Veränderungen des pH-Wertes. So gedeihen Listerien optimal in neutralem bis schwach alkalischem Milieu (SEELIGER 1958, KRAMER und JONES 1969). Eine Säuerung des Untersuchungsmaterials stellt nach BOJSEN-MØLLER (1966) einen wichtigen Hemmfaktor dar.

SEELIGER et al. (1970) weisen darauf hin, daß die Anzüchtung von L.m. aus stark bakterienhaltigem Material durch kurze Versandzeiten begünstigt zu werden scheint. Da dies in praxi jedoch häufig nicht gegeben ist, bietet sich die Einführung von Transportmedien in die Listeria-Diagnostik an.

STUART (1959) beschrieb ein Medium zum Transport von Untersuchungsmaterialien, die mit empfindlichen Keimarten, wie Neisseria gonorrhoeae, Haemophilus pertussis, Trichomonas vaginalis oder Shigella spec. infiziert waren. Dieses Transportmedium hat sich in der Zwischenzeit bestens im Routinebetrieb bewährt.

Das STUART-Medium ist ein Wasser-Agar-Gel-Substrat, das die Keime weitgehend vor mechanischen Schädigungen schützt. Als Reduktionsmittel zur Verhinderung schädlicher oxydativer Stoffwechselprozesse dient Natriumthioglykolat. Der neutrale pH-Wert wird durch Phosphatpuffer stabilisiert. Als Reduktionsindikator dient Methylenblau.

Einsaat von Listeria-Reinkulturen in STUART-Medium und Bebrütung bei Zimmertemperatur ließ eine deutliche Vermehrung von L.m. innerhalb des ersten Versuchstages auf Werte erkennen, die sich während der folgenden 7-tägigen Beobachtungsdauer nicht mehr wesentlich änderten (Abb. 3). Einen weniger typischen Verlauf der Wachstumskurve zeigte allerdings ein alter Listeria-Referenzstamm. GÄSTRIN et al. (1968) stellten hingegen bei 5-tägiger Beobachtungsdauer einer an Holzkohle imprägnierte Abstrichtupfer absorbierten Reinkultur von L.m. keine Keimvermehrung fest.

MÖLLER (1966, cit. GÄSTRIN et al. 1968) beschrieb ein anderes Transportmedium (VMG), das sich zum Transport von Streptokokken und anaeroben, nicht sporenbildenden Bakterien in Zahnpulpaproben als geeignet erwies. Im Gegensatz zum STUART-Medium enthält dieses Medium neben einem Bakteriostatikum (Phenylquecksilberacetat) Nährstoffe, die selektiv das Wachstum der gesuchten Keimarten fördern sollen.

Bei der Prüfung des VMG-Mediums zum Transport von Listeria-Stämmen (Abb. 5) vermehrten sich die Keime trotz niedrigerer Einsaat (500-800 Zellen/ml) als bei Prüfung des STUART-Mediums (1200-1800 Zellen/ml) (Abb. 3) innerhalb der zwei ersten Versuchstage um etwa 1 - 2 Log. stärker als im STUART-Medium. Während der weiteren Versuchsdauer (6 Tage) blieb dann die Keimzahl nahezu konstant. Hier

entsprechen die Ergebnisse prinzipiell denen GÄSTRIN's et al. (1968), die allerdings einen etwas allmählicheren Anstieg der Listeria-Keimzahl über die gesamte Versuchsdauer beschrieben. Die in den eigenen Versuchen ermittelte Vermehrung von Listeria-Reinkulturen im STUART-Medium entspricht in etwa den von KAMPELMACHER und VAN NOORLE JANSEN (1968) erhobenen Befunden.

Eigene Untersuchungen mit Enterokokkenreinkulturen im STUART- und VMG-Transportmedium ließen auch für diese Keime eine starke Vermehrung innerhalb der ersten 24 Stunden erkennen, obwohl die Einsaat mit 150 bis 200 Zellen/ml wesentlich niedriger lag als die Listeria-Keimeinsaat (Abb. 4, Abb. 6).

Als Anreicherungsverfahren zur Isolierung von L.m. aus mischinfizierten Untersuchungsmaterialien hat sich die sog. Kälteanreicherung (GRAY et al. 1948) bewährt. Sie beruht darauf, daß sich Listerien wie psychrophile Keime bei + 4°C vermehren, während das Wachstum der Begleitflora weitgehend sistiert. Für den klinischen Betrieb hat diese Nachweismethode jedoch den großen Nachteil, daß bis zum positiven Ergebnis oft Wochen bis Monate vergehen. So isolierte BOJSEN-MØLLER Listerien aus + 4° C-Kälteanreicherungen in Zeiträumen von 2 Wochen bis 6 Monaten. Bei KAMPELMACHER und VAN NOORLE JANSEN wurden einige Proben sogar erst nach 30-monatiger Kälteanreicherung positiv!

Daraus wird deutlich, daß die Kälteanreicherungsmethode weniger für den klinischen Routinebetrieb, bei dem es auf eine möglichst kurzfristige Diagnostik ankommt, geeignet erscheint, als für epidemiologische Studien.

Als günstiges Medium zur selektiven Isolierung von L.m. infolge der Unterdrückung der gramnegativen Begleitflora erwies sich der von BEERENS und TAHON-CASTEL (1966) eingeführte Nalidixinsäure-Blutagar-Nährboden (NBA). WOOD (1969) sowie KAMPELMACHER und VAN NOORLE JANSEN (1969) benutzten ihn erfolgreich.

Nalidixinsäure greift hemmend in den Mechanismus der DNS-Synthese gramnegativer Bakterien während der aktiven Wachstumsphase ein (GOSS et al. 1964). Eine Nalidixinsäure-Konzentration von 40 µg/ml wirkt auf Listerien und Enterokokken nicht wachstumshemmend. Höhere Konzentrationen führen zur Schädigung der Keime in Form von verstärkter Gramlabilität und filamentösem Wachstum (BOCKEMÜHL et al. 1971). Nachteilig wirkt sich die Resistenz verhältnismäßig vieler gramnegativer Stämme besonders der Gattung Proteus und Pseudomonas aus.

Die Verwendung von 3,75 % Kaliumthiocyanat (LEHNERT 1964) als KSCN-Tryptose-Bouillon zur Unterdrückung gramnegativer Begleitflora hat sich als besonders wirkungsvoll erwiesen. Die von SEELIGER et al. (1970) beschriebene selektive Hemmwirkung auf Enterokokken während der ersten 4 Tage konnte in eigenen Versuchen mit anderen Stämmen leider nicht bestätigt werden. Das Wachstum von 3 Listeria- und Enterokokkenstämmen erreichte nach Voranreicherung in KSCN-Tryptose-Bouillon nach 2 bis 5 Tagen seinen Gipfel und blieb dann bis zum 8. bzw. 12. Versuchstag relativ konstant (Abb. 1, Abb. 2).

Die Wirkungsweise von Kaliumthiocyanat ist noch nicht völlig geklärt. Möglicherweise liegt der Angriffspunkt an den eisenhaltigen Proteinen, z.B. den Cytochromen, da SCN-Ionen mit Fe-Ionen komplexe Verbindungen einzugehen vermögen (KRAMER und JONES 1969). Der Cytochromgehalt von

L.m. ist besonders bei Züchtung auf Nährböden mit niedrigem Gehalt an Hefeextrakt nicht sehr groß (KRAMER und JONES 1969).

Die Katalase- und Benzidinreaktion ist häufig zweifelhaft oder negativ; Enterokokken sind stets Katalase-negativ. Die günstigen Isolierungsversuche für L.m. von LEHNERT (1964) und WOOD (1969) sind wahrscheinlich in erster Linie auf eine völlige Unterdrückung der gramnegativen Begleitflora zurückzuführen, wogegen das Listeria-Wachstum nur teilweise gehemmt wird.

Die selektive Hemmung von Enterokokken, die den Listerien kulturell sehr nahe stehen, in Stuhlproben jedoch in weitaus größerer Menge vorhanden sind, ist von vielen Autoren durch Zugabe bzw. Kombination verschiedener Hemmsubstanzen versucht worden. RALOVICH et al. (1971) beschrieben günstige Ergebnisse bei Verwendung von Acridinfarbstoffen in festen Nährböden. Besonders gute Ergebnisse erhielten sie bei Anwendung von Xanthacridin, einem Acridinfarbstoff sowjetischer Herkunft (persönl. Mitteilung 1969). Auch die spätere Verwendung von Trypaflavin (50 µg/ml) in Kombination mit Nalidixinsäure (50 µg/ml) in festen Nährböden erbrachte günstige Ergebnisse (RALOVICH et al. 1971).

Die Anwendbarkeit von Acridinfarbstoffen mit und ohne Nalidixinsäure in flüssigen Anreicherungsmedien wurde von HÖHNE (1972) untersucht. Dabei erwies sich Xanthacridin in einer Konzentration von 10 µg/ml bei Zimmertemperatur als besonders günstig.

Acridinfarbstoffe greifen in einen Oxydationsprozeß ein, der wahrscheinlich mit der Synthese der Desoxyribose in Zusammenhang steht (WALLHÄUSER und SCHMITT 1967), wohingegen KUSCHINSKY und LÜLLMANN (1967) eine Beeinflussung

der Atmungskette der Bakterien durch Acridine vermuten. Da grampositive Keime gegenüber Acridinfarbstoffen empfindlicher sind als gramnegative Keimarten, ist die Isolierung von L.m. aus mischinfiziertem Material nur dann erfolgreich, wenn möglichst geringe Acridin-Konzentrationen kombiniert mit Substanzen verwendet werden, die gegen die gramnegativen Keime wirksam sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun untersucht, wieweit durch hintereinander geschaltete Anwendung des STUART-Transportmediums mit anschließender Anreicherung in flüssigen, Acridin-haltigen Medien und Aussaat auf feste Acridin-haltige Selektivnährböden, sowie mittels Modifikation des STUART-Mediums durch Zugabe spezifisch wirkender Substanzen mit und ohne anschließender Anreicherung eine Verbesserung der Isolierungsmethodik für L.m. erreicht werden kann. In allen Versuchen zeigte sich eine deutliche Vermehrung der Listerien sowohl in natürlich als auch künstlich infizierten Stuhlproben bei Aufbewahrung in STUART-Medium. Der Grad der endgültigen Keimzunahme war allerdings sehr davon abhängig, welche Anreicherungsmedien und Selektivnährböden im Anschluß an die Aufbewahrung im STUART-Medium verwandt wurden. Dagegen zeigten positive Stuhlproben, die nicht im STUART-Medium aufbewahrt waren und ohne Anreicherung direkt auf den bisher in der Routine verwandten Tryptose-Agar ohne Zusatz ausgespatelt wurden, die geringste Zahl erkennbarer Listeria-Kolonien (Abb. 8). Die Zahl erkennbarer Listeria-Kolonien wurde kurzfristig gesteigert nach 2-tägiger Anreicherung in 3,75 % KSCN-Acridin-Bouillon bei Zimmertemperatur (Acridin-Konzentration 10 µg/ml) und anschließender Aussaat auf Acridin-Nalidixinsäure-haltige Tryptose-Agar-Platten, mit einem Gipfel um den 3. bis 5. Versuchstag (Abb. 7). Die Nalidixinsäure-Konzentration betrug 40 µg/ml, die Acridinfarbstoff-Kon-

zentration 10 bzw. 25 µg/ml. Wie aus den Abb. 9 - 17 hervorgeht, ergab die Verwendung der beiden Farbstoff-Konzentrationen keinen deutlichen Unterschied für die Anwachsrate von L.m. aus mischinfiziertem Untersuchungsmaterial.

Im Gegensatz dazu fanden BOCKEMÜHL et al. (1971) bei der Untersuchung von Reinkulturen von L.m. bzw. Enterokokken bei Acridin-Konzentrationen von 25 µg/ml gegenüber 10 µg/ml zwar eine Steigerung der Selektivität des Nährbodens, jedoch auf Kosten der Listerienanwachsrate. Weiterhin ließ sich kein wesentlicher Unterschied für die Listeria-Ausbeute bei Verwendung der beiden Acridinfarbstoffe Acriflavin neutral und Proflavinhemisulfat zeigen; mit beiden Farbstoffen wurden ähnlich gute Ergebnisse erzielt. Als besonders günstig für die Erkennung von L.m.-Kolonien erwies sich allerdings der Farbstoff Acriflavin neutral infolge der charakteristischen Färbung der Listeria-Kolonien bei Schrägdurchlichtbetrachtung (HENRY 1933). Die auf diesem Nährboden angewachsenen Listeria-Kolonien fallen durch ihre intensiv gras- bis gelbgrüne, irisierende Färbung im Gegensatz zu den schwächer gelb bis goldgelb schillernden Enterokokkenkolonien sofort auf. Bei Zusatz von Proflavinhemisulfat dagegen erscheinen Listeria-Kolonien bei Schrägdurchlichtbetrachtung als schwächer blau- bis graugrün irisierende Kolonien.

Wichtig für die Erkennung verdächtiger Kolonien bei Schrägdurchlichtbetrachtung ist eine geringe Schichtdicke der Acridin-Nalidixinsäure-Nährböden. Optimale Beurteilung ist bei 10 bis 13 ml Nährboden je Petrischale gegeben. Wird eine größere Schichtdichte gewählt, verlieren die angewachsenen Listeria-Kolonien ihre charakteristische Farbgebung und sind wegen ihrer mehr diffusen grau-grünlichen Färbung von den übrigen angewachsenen Keimarten schlechter abgrenzbar.

Die neben den quantitativen Untersuchungen durchgeführten semiquantitativen Untersuchungen (Abb. 7 und 8), bei denen das Untersuchungsmaterial mittels einer Öse von 5 mm Durchmesser auf die Nähragar-Platten fraktioniert ausgestrichen wurde, entsprechen in der Beimpfung der Agarplatten der in der Routinediagnostik üblichen Arbeitstechnik und ergeben somit Ergebnisse für das Anwachsen von L.m. wie sie möglicherweise in der Routine zu erwarten sind: Bei Aufbewahrung des Untersuchungsmaterials im STUART-Medium und anschließender Anreicherung in KSCN-Acridin-Bouillon kommt es zu einer wesentlich früheren Vermehrung der Listerienzahl (Abb. 7) als bei alleiniger Verwendung des STUART-Mediums (Abb. 8).

Um die Verarbeitung mischinfizierten Materials mit Hilfe des Transportmediums, der 2-tägigen Anreicherung in KSCN-Acridin-Bouillon und anschließender Aussaat auf Acridin-Nährböden zu verkürzen und vereinfachen, wurde versucht, das STUART-Medium durch Zugabe von Nalidixinsäure (40 µg/ml) und Acridinfarbstoff (10 µg/ml) zu einem kombinierten Transport-Anreicherungsmedium für L.m. zu modifizieren. Wie aus Abb. 11 - 14 hervorgeht, vermehren sich Listerien in natürlich infizierten Stuhlproben in diesem Listeria-Transport-Anreicherungsmedium (LTA-Medium) wesentlich stärker als im STUART- und VMG-Medium. Die Verwendung dieses kombinierten Transport-Anreicherungsmediums bedeutet eine wesentliche Verkürzung der Diagnostik, da die Keime bereits während der Transportdauer eine deutliche Vermehrung erfahren. Bei Verwendung des nicht modifizierten STUART- bzw. VMG-Mediums läßt sich eine ähnliche Zunahme der Listerien nur bei anschließender 2-tägiger Anreicherung in KSCN-Acridin-Bouillon bei Zimmertemperatur erzielen, die bei Verwendung des LTA-Mediums überflüssig wird (Abb. 11 bis 14).

Bei quantitativen Untersuchungen an mit 3 verschiedenen Listeria-Stämmen künstlich infizierten Stuhlproben ließ sich dieser Anreicherungseffekt des LTA-Mediums deutlich demonstrieren. Nach Einsaat unterschiedlich geringer Keimzahlen (30, 70, 150 Keime/ml Stuhl) nahm die Zahl anwachsfähiger Einheiten bis zum 5. bzw. 6., 7. Tag zu und blieb bei längerer Beobachtungszeit praktisch auf diesem Niveau (Abb. 15 bis 17). Dabei ist auffallend, daß neben der recht konstanten Vermehrungsphase bis zum 5. bis 6. Tag die Listeria-Keimzahl am Ende dieser Zeit etwa zwischen 10^6 und 10^7/ml liegt ohne deutliche Abhängigkeit, welche Keimmenge ursprünglich im Untersuchungsmaterial vorlag. Weiterhin ließen sich keine Unterschiede bei Verwendung der Farbstoffe Acriflavin neutral bzw. Proflavinhemisulfat im LTA-Medium zeigen.

Die von BOCKEMÜHL und Mitarbeitern (1971) bei der Untersuchung von Reinkulturen beobachteten Unterschiede der Anwachsrate von L.m. auf festen Nährböden bei Verwendung verschiedener Acridinfarbstoffe und -konzentrationen scheinen somit bei der Isolierung von L.m. aus mischinfizierten Untersuchungsmaterialien von geringerer Bedeutung zu sein.

Parallel zu den experimentellen Untersuchungen wurden die neuen Isolierungsmethoden an Untersuchungsmaterial der Routine des Labors geprüft. Bei insgesamt 521 verarbeiteten Stuhlproben ließen sich in 6 Fällen (1,15 %) Listerien isolieren.

Bei 2 von 42 Schlachthofarbeitern (Kopfschlächter und sog. "Kuddelarbeiter") mit positivem Stuhlbefund wurden 4 Tage später erneut Stuhlproben entnommen und nach der beschriebenen Methode verarbeitet, wobei sich jedoch keine Listerien mehr nachweisen ließen. Ein weiterer Isolierungsver-

such nach 4 Wochen blieb ebenfalls erfolglos. Entsprechende Beobachtungen machten BOJSEN-MØLLER et al. (1966), wonach die Ausscheidung von L.m. beim Menschen meist nur wenige Tage, in einigen Fällen jedoch manchmal 6 Monate dauern soll. Dagegen vermutet ORTEL (1971) aufgrund von 1969 und 1970 erhobenen positiven Listeria-Stuhlbefunden bei klinisch gesunden Hebammen, daß diese sich möglicherweise bei ihrer Arbeit während der Listeriose-Epidemie 1966 im Bezirk Halle infiziert hätten, was einer Ausscheidung über immerhin 3 bis 4 Jahre entspräche. Dabei ist aufgrund der starken endemischen Verbreitung von L.m. in diesem Gebiet eine wiederholte Reinfektion allerdings nicht auszuschließen.

Die beiden eigenen positiven Listeria-Befunde bei 42 Schlachthofarbeitern (4,7 %) bestätigen die Ergebnisse von BOJSEN-MØLLER und JESSEN, die bei Stuhluntersuchungen von 1150 Schlachthofarbeitern 55 positive Listeria-Befunde hatten (4,8 %). Ähnliche Ergebnisse zeigt auch der Vergleich von 1040 in gynäkologischen und medizinischen Kliniken hospitalisierten Patienten mit 12 positiven Listeria-Befunden (1,1 %) bei BOJSEN-MØLLER bzw. 4 eigenen positiven Kulturen bei 472 Patientinnen (0,8 %) dreier Frauenkliniken. Während jedoch BOJSEN-MØLLER's Befunde mittels der langwierigeren Kälteanreicherung erhoben wurden, gelangen die eigenen Isolierungen innerhalb weniger Tage.

Gleiches gilt für eine Gegenüberstellung der am Würzburger Hygiene-Institut auf L.m. durchgeführten Stuhluntersuchungen der Jahre 1965 bis Mitte 1969 (SANDER 1969) mit den vorliegenden Untersuchungen eines halben Jahres. Von 16 Listeria-positiven Stuhlproben unter 1113 untersuchten Materialien (1,4 %) des obengenannten Autors waren 4 Subkulturen nach 2 Tagen und eine Stuhlprobe beim Sofortausstrich positiv, während 11 Proben erst nach 3- bis 6-monatiger Kälteanreicherung positive Befunde erbrachten. Von den 6 Listeria-positiven Befunden der 521 eigenen Untersu-

chungen wurden 5 nach 2-tägiger Anreicherung bei Zimmertemperatur schon positiv, der sechste nach 6 Wochen Kälteanreicherung bei + 4° C, während die 6-wöchige und 3- bzw. 6-monatige Kälteanreicherung bei 521 Stuhlproben in Tryptose-Bouillon bei + 4° C keine zusätzlichen positiven Befunde erbrachte.

Aus 289 Stuhlproben zweier Frauenkliniken, die inzwischen im neuen LTA-Medium bis Ende 1971 eingeschickt und auf Listerien untersucht wurden, ließen sich weiterhin zweimal Listerien durch Direktaussaat auf Acridin-Nalidixin-Nährböden isolieren (L.m. Nr. 178/71 Typ 4b, L.m. Nr. 179/71 Typ 4b).

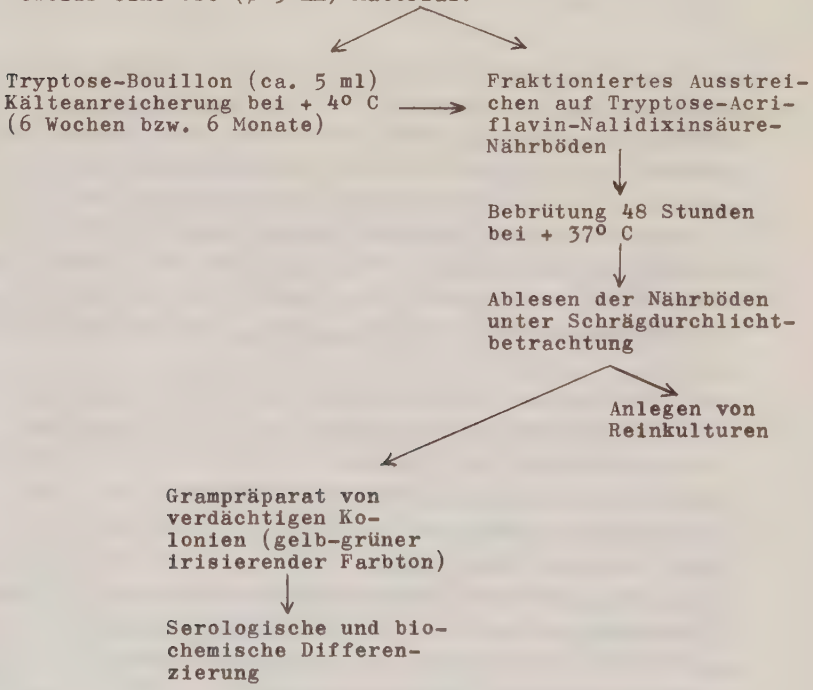
Zwar ließ sich durch diese Methode die Listeria-Ausbeute im Einzugsgebiet des Würzburger Hygiene-Instituts nicht wesentlich steigern; doch wurden die positiven Befunde mit großer Zuverlässigkeit bereits nach wenigen Tagen erhoben, ohne daß die zeitraubende Kälteanreicherung zusätzlich positive Ergebnisse erbracht hätte. Positive Befunde nach 2-tägiger Bearbeitung ermöglichen aber dem behandelnden Arzt eine, falls notwendig, schnelle Therapie und ggf. auch Maßnahmen zur Verhütung einer weiteren Ausbreitung.

Zusammenfassend lassen sich die Vorteile des Listeria-Transport-Anreicherungsmediums wie folgt darstellen: Bereits während des Transportes von Untersuchungsmaterial kommt es zu einer wesentlichen Vermehrung von Listerien. Die höchste Keimzahl ist ungefähr zwischen dem 5. und 7. Tag erreicht. Nachfolgende direkte Aussaat auf feste Acridin-Nalidixinsäure-Nährböden ermöglicht nach 48-stündiger Bebrütung bei + 37° C unter Schrägdurchlichtbetrachtung eine sichere Erkennung von Listeria-Kolonien. Die Zuverlässigkeit dieser Methode entspricht der bewährten, aber langwierigen und aufwendigen Kälteanreicherung. Die Methodik ist unten schematisch dargestellt.

Listeria-Nachweis in stark verunreinigtem Untersuchungsmaterial

Nativmaterial (ca. erbs- bis kirschgroße Probe) in LTA-Medium; 13 ml LTA-Medium (nicht älter als 4 Wochen) in sterilen zu 4/5 gefüllten Plastikröhrchen. Material soll mittels eines im Stopfen des Röhrchens angebrachten Löffels vollständig in das Medium tauchen, das Röhrchen luftdicht verschlossen sein.
Verschickung des Plastikröhrchens mit LTA-Medium und Untersuchungsmaterial in Blechhülsen und Holzkästchen nach den allgemeinen Bestimmungen. Materialverarbeitung innerhalb von 3 - 10 Tagen nach Entnahme vom Patienten.

Jeweils eine Öse (Ø 5 mm) Material:



E. Z U S A M M E N F A S S U N G

Der Einfluß von Transportmedien auf die Anzüchtung von Listerien aus mischinfiziertem Untersuchungsmaterial wurde überprüft. Zur Untersuchung kamen das STUART-Transportmedium, das VMG-Medium nach MÖLLER und ein von uns aus dem STUART-Medium weiterentwickeltes Listeria-Transport-Anreicherungs-(LTA-) Medium. Dabei wurden folgende Hauptbefunde erhoben:

1) In allen Versuchen mit Listerien in natürlich und künstlich infizierten Stuhlproben zeigte sich eine deutliche Vermehrung von L.m. nach Aufbewahrung des Untersuchungsmaterials im STUART-Medium. Der Grad der endgültigen Keimausbeute war allerdings sehr von der Anwendung von Anreicherungsmedien und Selektivnährböden im Anschluß an die Aufbewahrung im STUART-Medium abhängig.

2) Die günstigste Anwachsrate für L.m. ermittelte sich nach 2-tägiger Anreicherung bei + 22° C in 3,75 % Kaliumthiocyanat-Bouillon mit Zusatz von 10 µg/ml Xanthacridin und anschließender Aussaat auf Acriflavin neutral-Nalidixinsäure-haltige Tryptose-Agar-Platten (Acriflavin neutral-Konzentration: 10 µg/ml, Nalidixinsäure-Konzentration: 40 µg/ml) sowie deren Bebrütung über 48 Stunden bei + 37° C.

3) Bei Schrägdurchlichtbetrachtung fallen die auf diesem Nährboden angewachsenen Listeria-Kolonien durch ihre intensive gras- bis gelbgrüne irisierende Färbung im Gegensatz zu den schwächer gelb bis goldgelb schillernden Enterokokkenkolonien sofort auf, wobei eine optimale Beurteilung der Kolonien bei Schrägdurchlichtbetrachtung durch geringe Schichtdicke der Acridin-Nalidixinsäure-Nährböden (10 - 13 ml Nährboden je Petrischale) möglich wird.

4) Die Anwendung des Listeria-Transport-Anreicherungs-(LTA-) Mediums (STUART-Medium mit Acriflavin neutral (10 µg/ml) oder Proflavinhemisulfat (10 µg/ml) und Nalidixinsäure (40 µg/ml)) verkürzt und vereinfacht die Verarbeitung mischinfizierten Materials. Listerien vermehren sich in diesem Medium wesentlich stärker als im STUART- und VMG-Medium. Schon während des Transports von Untersuchungsmaterial im LTA-Medium kommt es zu einer selektiven Vermehrung von Listerien, wobei eine nachfolgende 2-tägige Anreicherung in Acridin-haltiger KSCN-Bouillon überflüssig wird. Die höchste Listeria-Keimzahl ist ungefähr 5 bis 7 Tage nach Einimpfen des Untersuchungsmaterials in das LTA-Medium zu erwarten. Nachfolgende Aussaat auf Acridin-Nalidixinsäure-Nährböden ermöglicht nach 48-stündiger Bebrütung bei + 37° C unter Schrägdurchlichtbetrachtung eine sichere Erkennung von Listeria-Kolonien.

5) Parallel zu den experimentellen Untersuchungen wurden die neuen Isolierungsmethoden am Untersuchungsmaterial der Routine des Labors geprüft. Bei insgesamt 521 verarbeiteten Stuhlproben von Dezember 1970 bis Juni 1971 ließen sich in 6 Fällen Listerien isolieren. Dabei wuchsen Listeria-Kolonien gehäuft auf farbstoffhaltigem Nähragar von Material, das vorher in STUART-Medium gelagert war. Auf herkömmlichen Tryptose-Agar-Platten wuchsen hingegen L.m.-Kolonien nur ganz vereinzelt.

5 der Listeria-positiven Befunde wurden nach 2-tägiger Anreicherung bei Zimmertemperatur positiv, die sechste nach 6 Wochen Kälteanreicherung bei + 4° C, während die 6-wöchige, 3- bzw. 6-monatige Kälteanreicherung in Tryptose-Bouillon bei + 4° C keine positiven Befunde erbrachte.

Aus 289 Stuhlproben zweier Frauenkliniken, die inzwischen im LTA-Medium bis Ende 1971 eingeschickt wurden, ließen sich zweimal Listerien durch Direktaussaat auf Acridin-Nalidixinsäure-Nährböden isolieren.

F. K U R V E N Ü B E R S I C H T

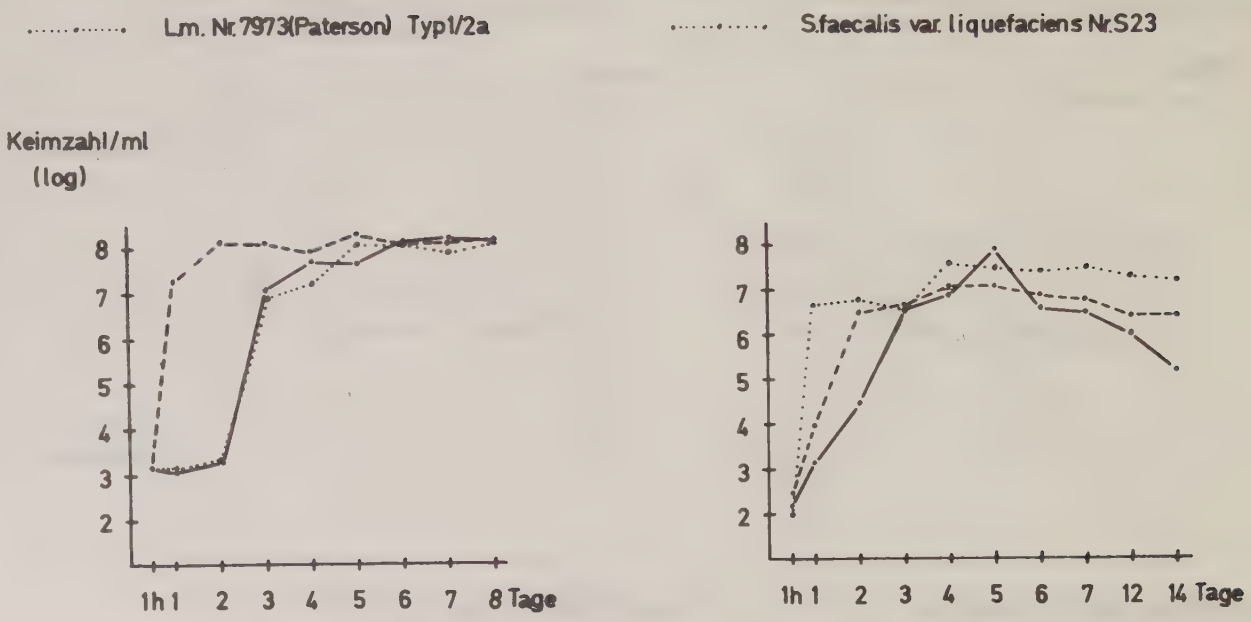


Abb. 1: Wachstumskurven für L. monocytogenes bei + 22° C

Abb. 2: Wachstumskurven für S. faecalis und S. faecalis var. liquefaciens bei + 22° C

in 3,75 % Kaliumthiocyanatbouillon

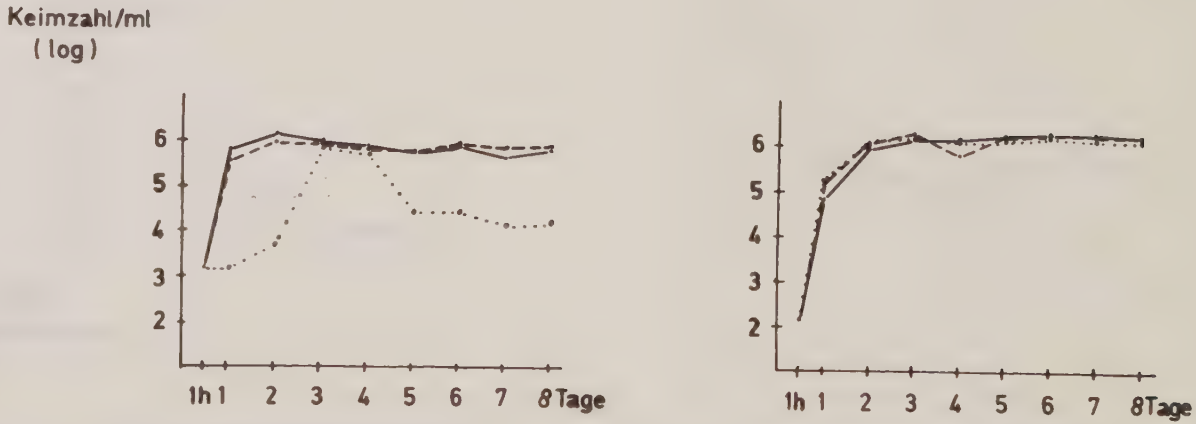


Abb. 3: Wachstumskurven für L. monocytogenes bei + 22°C

Abb. 4: Wachstumskurven für S. faecalis bei + 22°C

im STUART-Transportmedium

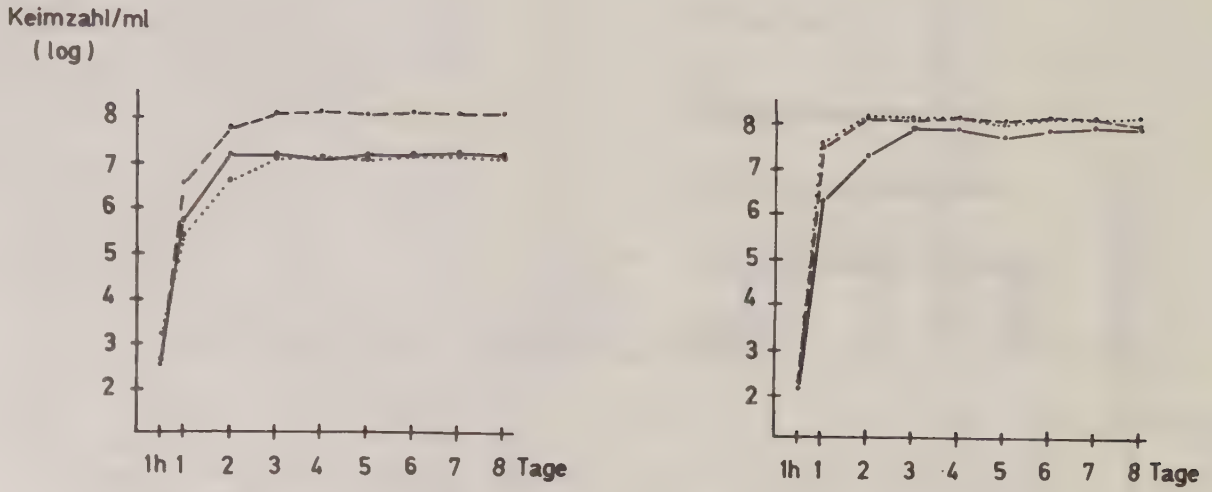


Abb. 5: Wachstumskurven für L. monocytogenes bei + 22° C im VMG-Transportmedium

Abb. 6: Wachstumskurven für S. faecalis bei + 22° C

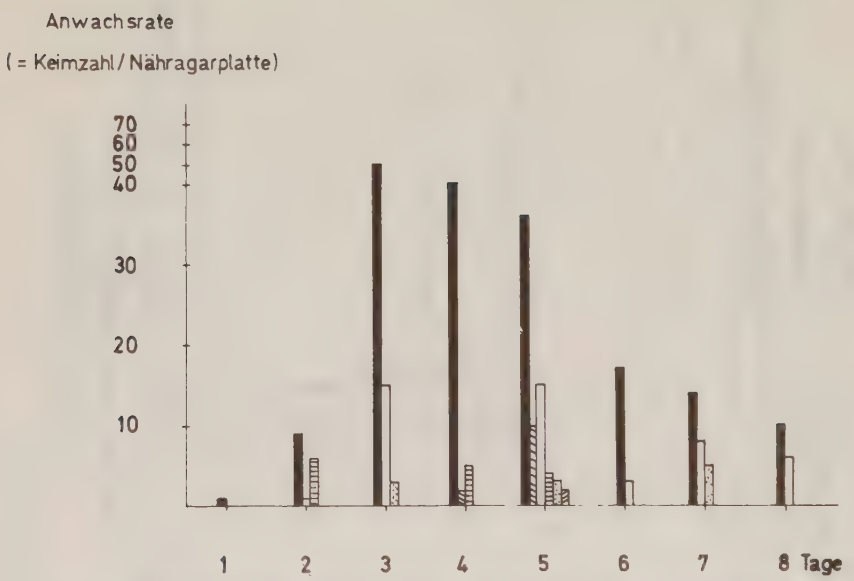


Abb. 7: Semiquantitative Erfassung der Anwachsrate für L. m. Nr. 245/70 Typ 4b in künstlich infiziertem Stuhl bei Aufbewahrung in und ohne STUART-Medium und anschließender Anreicherung in KSCN-Acridinbouillon (Eingeimpfte Keimzahl: 1300/ml).

Keimzahl auf Agarplatten mit Acriflavin neutral (10 µg /ml) und Nalidixinsäure (40 µg/ml) nach Lagerung im STUART-Medium.

Keimzahl auf Agarplatten mit Acriflavin neutral (10 µg/ml) und Nalidixinsäure (40 µg/ml) ohne Lagerung im STUART-Medium.

Keimzahl auf Agarplatten mit Proflavinhemisulfat (10 µg/ml) und Nalidixinsäure (40 µg/ml) nach Lagerung im STUART-Medium.

Keimzahl auf Agarplatten mit Proflavinhemisulfat (10 µg/ml) und Nalidixinsäure (40 µg/ml) ohne Lagerung im STUART-Medium.

Keimzahl auf Tryptose-Agar-Platten nach Lagerung im STUART-Medium.

Keimzahl auf Tryptose-Agar-Platten ohne Lagerung im STUART-Medium.

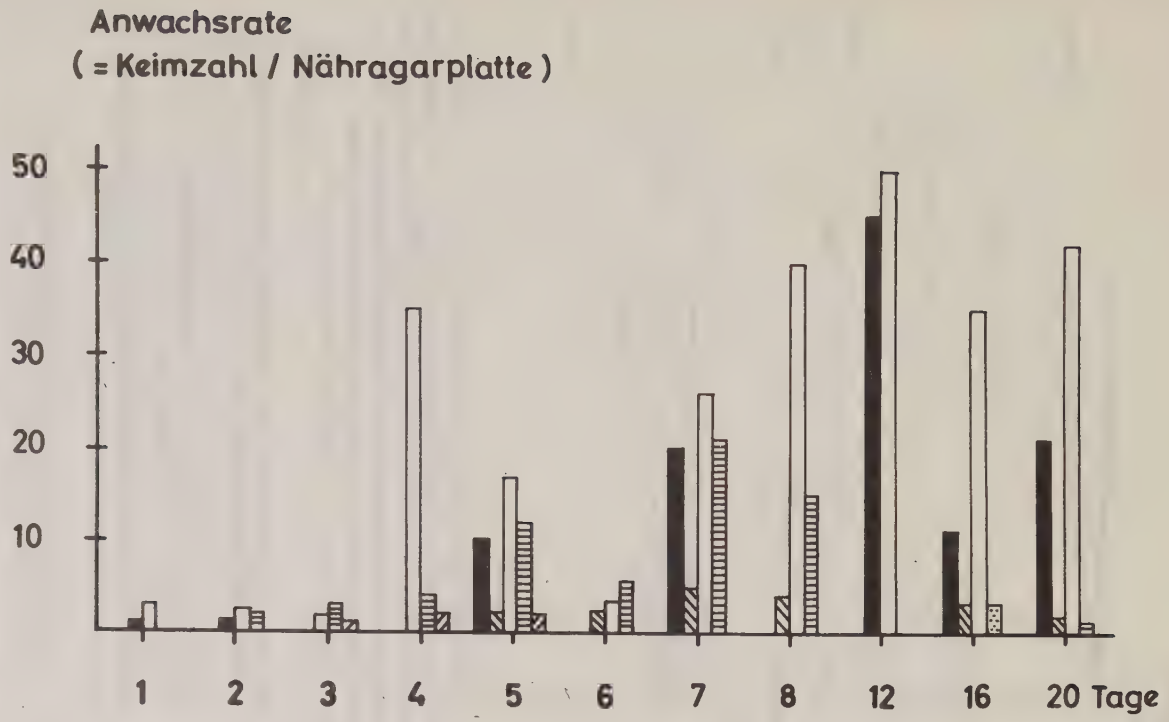
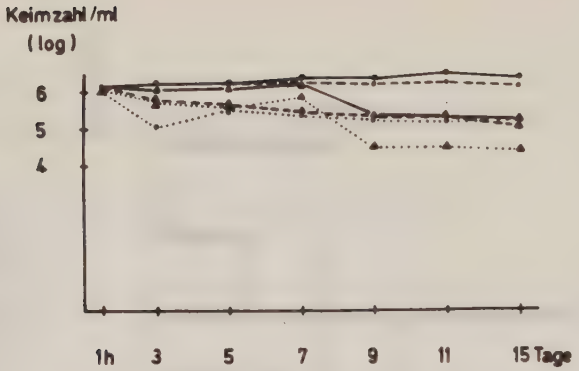


Abb. 8: Semiquantitative Erfassung der Anwachsrate für L.m. Nr. 245/70 Typ 4b in künstlich infiziertem Stuhl bei Aufbewahrung in und ohne STUART-Medium ohne anschließende Anreicherung in KSCN-Acridinbouillon (Eingeimpfte Keimzahl : 500/ml).

Legende : s. Abb. 7



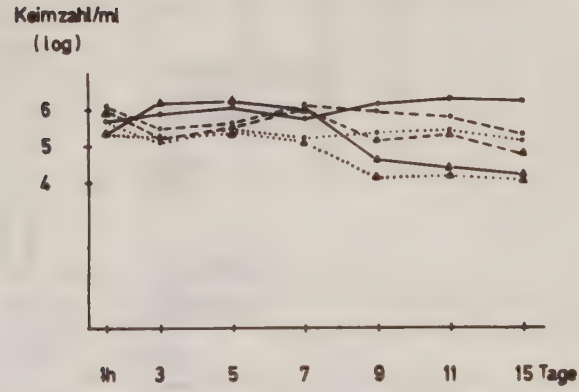


Abb. 9: Quantitative Erfassung der Anwachsrate für L.m. Nr. 93/71 Typ 4f in
Abb.10: natürlich infiziertem Stuhl auf Acriflavin neutral-haltigem Nähragar
(Abb. 9: 10 µg/ml, Abb. 10: 25 µg/ml) nach Lagerung in und ohne
STUART-Medium.

·—·—· nach Lagerung im STUART-Medium und anschließender 2-Tage-Anreicherung in Xanthacridinhaltiger KSCN-Bouillon

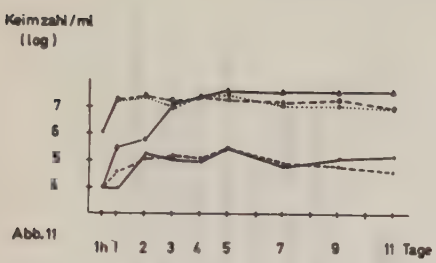
····· ohne Lagerung in STUART-Medium nach 2-Tage-Anreicherung in Xanthacridinhaltiger KSCN-Bouillon

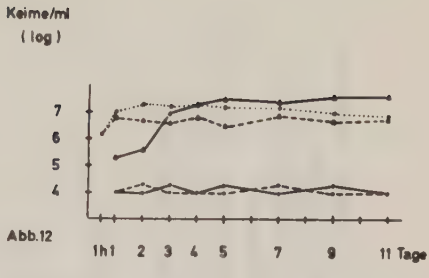
▲—▲—▲ nach Lagerung im STUART-Medium ohne anschließender 2-Tage-Anreicherung in Xanthacridinhaltiger KSCN-Bouillon

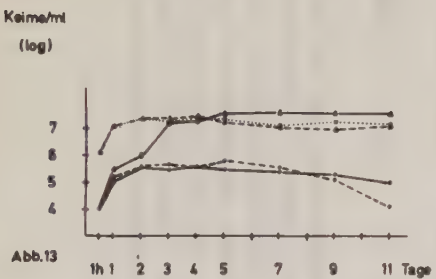
▲···▲···▲ ohne Lagerung im STUART-Medium und ohne anschließender 2-Tage-Anreicherung in Xanthacridinhaltiger KSCN-Bouillon

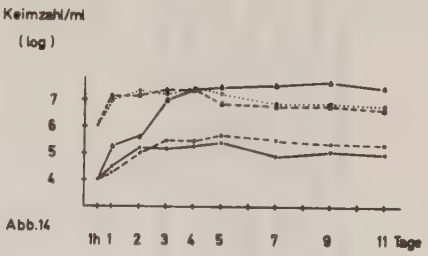
·–·–·–· nach Lagerung im STUART-Medium und anschließender 2-Tage-Anreicherung in KSCN-Bouillon

▲–·–▲–·–▲ ohne Lagerung im STUART-Medium nach 2-Tage-Anreicherung in KSCN-









Quantitative Erfassung des Wachstums für L.m. Nr. 78/71 Typ 4b in natürlich infiziertem Stuhl auf Acriflavin neutral-haltigen Nährböden unterschiedlicher Konzentration (Abb. 11: 10 µg/ml, Abb. 12: 25 µg/ml) und auf Proflavinhemisulfat-haltigen Nährböden unterschiedlicher Konzentration (Abb. 13: 10 µg/ml, Abb. 14: 25 µg/ml).

nach Lagerung in:

- STUART-Medium
- modifiziertem STUART-Medium (LTA-Medium)
- VMG-Medium
- STUART-Medium und anschlie ender 2-Tage-Anreicherung in acridinhaltiger KSCN-Bouillon
- VMG-Medium und anschließender 2-Tage-Anreicherung in acridinhaltiger KSCN-Bouillon

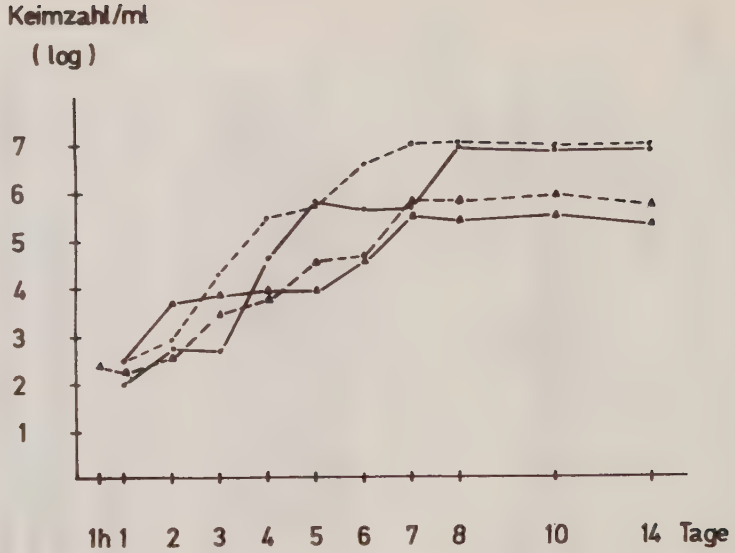


Abb. 15: Quantitative Erfassung der Anwachsrate für L.m. Nr. 245/70 Typ 4b in künstlich infiziertem Stuhl nach Lagerung in LTA-Medium mit 10 µg/ml Acriflavin neutral und 40 µg/ml Nalidixinsäure nach Aussaat auf Acriflavin neutral-haltigen Nährböden (Konzentration : 25 µg/ml)•——•——• (Konzentration:10 µg/ml)•---•---•bzw. nach Lagerung in LTA-Medium mit 10 µg/ml Proflavinhemisulfat und 40 µg/ml Nalidixinsäure und Aussaat auf Acriflavin neutral-haltige Nährböden (Konzentration: 25 µg/ml)▲——▲——▲ (Konzentration: 10 µg/ml)▲---▲---▲

eingeimpfte Keimzahl: 150/ml.

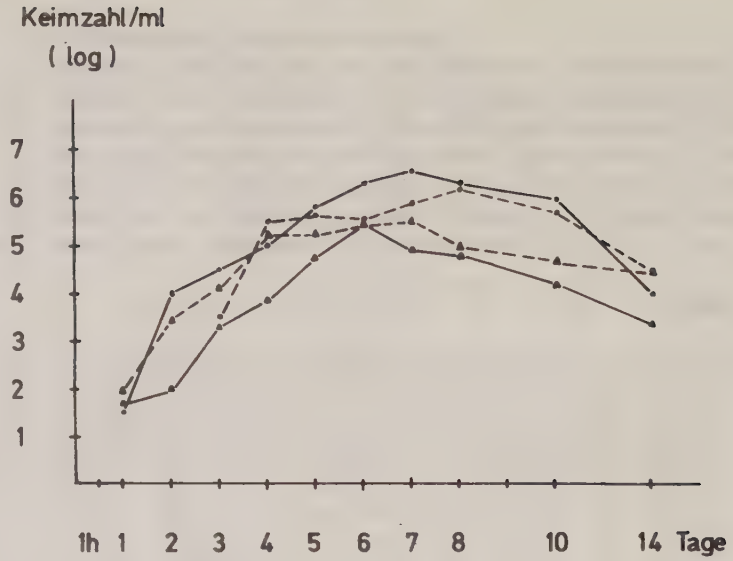


Abb. 16: Quantitative Erfassung der Anwachsrate für L.m. Nr. 253/70 Typ 4b in künstlich infiziertem Stuhl nach Lagerung in LTA-Medium mit 10 µg/ml Acriflavin neutral und 40 µg/ml Nalidixinsäure und Aussaat auf Acriflavin neutral-haltigen Nährböden (Konzentration: 25 µg/ml) ——·—— (Konzentration: 10 µg/ml)- - - - - bzw. nach Lagerung in LTA-Medium mit 10 µg/ml Proflavinhemisulfat und 40 µg/ml Nalidixinsäure und Aussaat auf Acriflavin neutral-haltige Nährböden (Konzentration: 25 µg/ml) ▲——▲——▲ (Konzentration: 10 µg/ml) ▲- - -▲- - -▲

eingeimpfte Keimzahl: 70/ml.

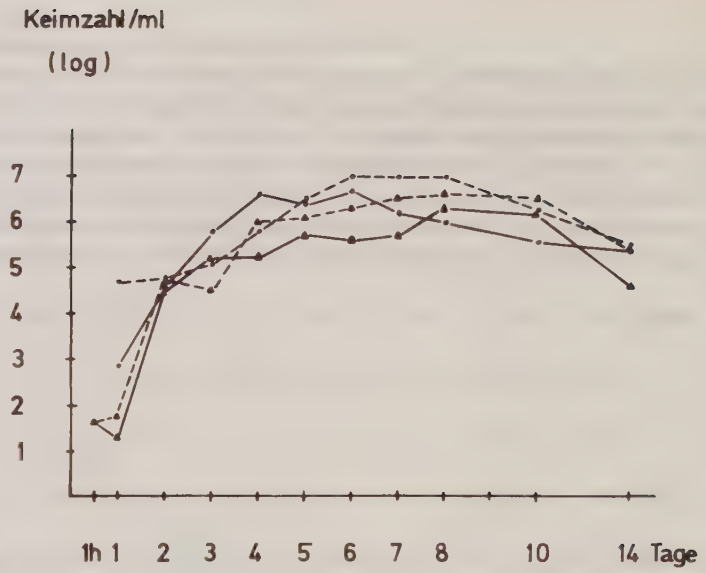


Abb. 17: Quantitative Erfassung der Anwachsrate für L.m. Nr. 71/71 Typ 1/2a in künstlich infiziertem Stuhl nach Lagerung in LTA-Medium mit 10 µg/ml Acriflavin neutral und 40 µg/ml Nalidixinsäure und Aussaat auf Acriflavin neutral-haltigen Nährböden (Konzentration: 25 µg/ml).——·——· (Konzentration: 10 µg/ml)--- ·-·-·bzw. nach Lagerung in LTA-Medium mit 10 µg/ml Proflavinhemisulfat und 40 µg/ml Nalidixinsäure und Aussaat auf Acriflavin neutral-haltige Nährböden (Konzentration: 25 µg/ml)▲——▲——▲ (Konzentration 10 µg/ml)▲---▲---▲

eingeimpfte Keimzahl: 30/ml.

G. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

ANDERSON, E. S.: The relations of bacteriophages to bacterial ecology. In: Microbial ecology. Symp. Soc. gen. Microbiol., 7th, 1957, 189 - 217, Cambridge.

BARON, A. L.: Handbook of antibiotics. New York, 1950.

BEERENS, H., TAHON-CASTEL, M. M.: Milieu à l'acide nalidixique pour l'isolément des streptocoques, D. pneumoniae, Listeria, Erysipelothrix. Ann. Inst. Pasteur 111, 90-93 (1966).

BIESTER, H. E., SCHWARTE, L. H.: Studies on Listerella infection in sheep. J. Infect. Dis. 64, 135-144 (1939).

BOCKEMÜHL, J., SEELIGER, H. P. R., KATHKE, R.: Acridinfarbstoffe in Selektivnährböden zur Isolierung von Listeria monocytogenes. Z. med. Mikrobiol. u. Immunol. 157, 84-95 (1971).

BOJSEN-MØLLER, J.: Growth of L. monocytogenes in mixed cultures and the isolation from faeces after incubation at 4° C. Proc. III. Intern. Symp. on Listeriosis, Bilthoven 1966, 51-63.

BOJSEN-MØLLER, J., JESSEN, O.: Occurence of Listeria monocytogenes in human faeces; epidemiological and pathogenetic aspects. Proc. III. Intern. Symp. on Listeriosis, Bilthoven 1966, 415-421.

DESPIERRES, M.: Isolement de Listeria monocytogenes dans un milieu défavorable à Streptococcus faecalis. Ann. Inst. Pasteur 121, 493-501 (1971).

ERREBO LARSEN, H.: Evaluation of the importance of antibiosis in isolation of Listeria monocytogenes. Proc. III. Intern. Symp. on Listeriosis, Bilthoven 1966, 415-421.

ERREBO LARSEN, H.: Listeria monocytogenes - Studies on isolation techniques and epidemiology. Carl Fr. Mortensen, Copenhagen, 1969.

GÄSTRIN, B., KALLINGS, L. O., MARCETIC, A.: The survival time for different bacteria in various transport media. Acta path. microbiol. scandinav. 74, 371-380 (1968).

GIRARD, K. F., SBARRA, A. J.: Some studies on the selective isolation of Listeria monocytogenes and their clinical applications with findings to date. II. Symp. on Listeric Infection. Montana State College, Bozeman 1962, 159-164.

GOSS, W. A., DEITZ, W. H., COOK, T. M.: Mechanism of action of nalidixic acid on Escherichia coli. J. Bacteriol. 88, 1112-1118 (1964).

GRAY, M. L., STAFSETH, H. J., THORP, F. jr., SHOLL, L. B., RILEY, W. F. jr.: A new technique for isolating Listerellae from the bovine brain. J. Bact. 55, 471-476 (1948).

HAMON, Y., PÉRON, Y.: Étude du pouvoir bactériocinogène dans le genre Listeria. I. Propriétés générales de ces bactériocines. Annls. Inst. Pasteur, Paris 103, 876-889 (1962).

HAMON, Y., PÉRON, Y.: Étude du pouvoir bactériocinogène dans le genre Listeria. II. Individualité et classification des bactériocines en cause. Annls. Inst. Pasteur, Paris 104, 55-65 (1963).

HENRY, B. S.: Dissociation in the genus Brucella. J. Infect. Dis. 52, 374-402 (1933).

HÖHNE, K.: Über die Entwicklung eines neuen selektiven Kombinationsmediums zum Nachweis von Listeria monocytogenes mit einem Hinweis auf den Listeriabefall des Schlachtschweines. Inaug. Diss., Würzburg; in Vorbereitung.

KAMPELMACHER, E. H., VAN NOORLE JANSEN, L. M.: Stuart's medium voor transport van materiaal verdacht vaan aanwezigheid van L. monocytogenes. Tijdschr. Diergeneesk. 93, 1297-1299 (1968).

KAMPELMACHER, E. H., VAN NOORLE JANSEN, L. M.: Isolation of Listeria monocytogenes from faeces of clinically healthy humans and animals. Zbl. Bakt. I Abt. Orig. 211, 353-359 (1969).

KUSCHINSKY, G., LÜLLMANN, H.: Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie. Thieme - Verlag, Stuttgart, 1967.

KRAMER, P. A., JONES, D.: Media selective for Listeria monocytogenes. J. appl. Bact. 32, 381-394 (1969).

LEHNERT, CH.: Bakteriologische, serologische und tierexperimentelle Untersuchungen zur Pathogenese, Epizootologie und Prophylaxe der Listeriose. Arch. exp. Vet. Med. 18, 981-1026 und 1247-1302 (1964).

MÖLLER, I. R. Å.: Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Akademiförlaget - Göteborg, 1966, cit. GÄSTRIN et al.: Acta path. microbiol. scandinav. 74, 371-380 (1968).

RALOVICH, B., FORRAY, A., MÉRÖ, E., MÁLOVIGS, H., SZAZADOS, I.: New selective medium for isolation of L. monocytogenes. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 216, 88-91 (1971).

ORTEL, S.: Ausscheidung von Listeria monocytogenes im Stuhl gesunder Personen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 217, 41-46 (1971).

SANDER, F.: Zum kulturellen Nachweis von Listeria monocytogenes. Inaug. Diss. Würzburg, 1969.

SEELIGER, H. P. R.: Listeriose.
2. Aufl. J. A. Barth, Leipzig, 1958.

SEELIGER, H. P. R.: Probleme der Listerioseforschung in
S. Liebe, R. Degen:
Probleme der Listeriose.
Symp. mit internat. Beteiligung
16. - 17. Mai, Leipzig 1968.
VEB G. Thieme, Leipzig, 1969.

SEELIGER, H. P. R.,
EMMERLING, P.,
EMMERLING, H.: Zur Verbreitung der Listeriose
in Deutschland.
Dtsch.Med. Wschr. 93, 2037-2043
(1968).

SEELIGER, H. P. R.,
SANDER, F.,
BOCKEMÜHL, J.: Zum kulturellen Nachweis von Listeria
monocytogenes.
Z. med. Mikrobiol. u. Immunol. 155,
352-368 (1970).

STUART, R. D.: Transport medium for specimens in
public health bacteriology. Publ.
Health Rep. Wash., 74 (5), 431-438
(1959).

WALLHÄUSER, K. H.,
SCHMIDT, H.: Sterilisation, Desinfektion, Konservierung, Chemotherapie.
Thieme-Verlag, Stuttgart, 1967,
258-262.

WOOD, D.: Isolation of Listeria monocytogenes.
In: Isolation methods for microbiologists, ed. by Shapton and Gould.
Acad. Press, London 1969, 63-69.

H. R E Z E P T E

Schafblut-Agar

Blutagar-Base (Oxoid)	40,0 g
Aqua dest.	1000,0 ml

15 Min. bei + 120° C autoklavieren
auf ca. + 50° C abkühlen
Zugabe von defibriniertem, sterilem
Schafblut 100,0 ml

Einfüllen von ca. 15 ml in Einweg-Kunststoff-Petrischalen (Durchmesser 8,5 cm).

Tryptose-Agar

Tryptose-Agar (Difco)	41,0 g
Aqua dest.	1000,0 ml
pH 7,2	

30 Min. kochen und anschließend
15 Min. bei + 120° C autoklavieren.

Einfüllen von ca. 12 ml in Einweg-Kunststoff-Petrischalen (Durchmesser 8,5 cm).

Acridin-Nalidixinsäure-Agar (Basis)

Tryptose-Agar (Difco)	41,0 g
Nalidixinsäure	0,04 g
Aqua dest.	1000,0 ml

Nach Sterilisation (15 Min. bei +120° C)
und Abkühlen auf ca. + 70° C wird der Acridin-farbstoff (Acriflavin neutral od. Proflavinhemi-

sulfat) als wässrige Stammlösung dem Grundgemisch zugesetzt (Acridin-Nalidixinsäure-Agar : 10 bzw. 25 µg/ml), gut durchmischt und in Einweg-Kunststoff-Petrischalen gegossen. Der beimpfte Nährboden wird 48 Std. bei + 37° C bebrütet. Die Ablesung des Acridin-Nalidixinsäure-Nährbodens erfolgt bei Schrägdurchlichtbetrachtung (Henry 1933). Eine optimale Beurteilung der angewachsenen Listeria-Kolonien ist bei 10 - 13 ml Nährboden je Petrischale gegeben.

Tryptose-Bouillon zur Kälteanreicherung

Tryptosephosphat-Brühe (Difco) entsprechend der Gebrauchsanweisung.

Kaliumthiocyanat-Bouillon mit Zusatz von 10 µg/ml Xanthacridin

Nutrient broth Nr. 2 (Oxoid)	25,0 g
Kaliumthiocyanat	37,5 g
Tween 80	1,0 g
Aqua dest.	1000,0 ml
pH 7,2	

Nach Sterilisation (15 Min. bei + 120° C) und Abkühlung auf + 4° C wird 10 µg/ml Xanthacridinumhydrochl. (2,8 Diamino-10-methylacridiniumchlorid) als wässrige Stammlösung dem Grundgemisch zugesetzt. Ca. 5 ml pro Reagenzglas abfüllen.

VMG (VMG IV) -Medium (MÖLLER 1966, cit. GÄSTRIN et al. 1968)

I: Gereinigter Agar (Oxoid)	7,0 g
Gelatine für bakteriologische Zwecke (Merck)	5,0 g
Tryptose	0,5 g
Fleischpepton (Merck)	0,5 g
Cysteinhydrochlorid	0,5 g
Thioglykolsäure	0,5 ml
Stamm-Salzlösung	100,0 ml
Aqua dest.	900,0 ml

II: Stamm-Salzlösung:

Phenylquecksilberacetat	0,05 g
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	2,4 g
KCl	4,2 g
NaCl	10,0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,0 g
Natriumglycerophosphat	100,0 g
Methylenblau	0,03 g
Aqua dest.	1000,0 ml
pH 7,5	

Ansatz I und II getrennt herstellen

I: Substanzen in 900,0 ml Aqua dest. lösen.
II: Substanzen in 1000,0 ml Aqua dest. lösen, außer Phenylquecksilberacetat.

Beide Ansätze sterilisieren (15 Min. bei + 120° C). Anschließend Phenylquecksilberacetat zu Ansatz II zufügen und 100 ml Stammsalzlösung (II) in Ansatz I überpipettieren und gut durchmischen.

STUART-Transportmedium (hergestellt aus handelsüblichem Trockensubstrat)

Natriumglycerophosphat	10,0	g
Natriumthioglycolat	1,0	g
Calciumchlorid	0,1	g
Methylenblau	0,002	g
Ionagar Nr. 2 (Oxoid L12)	2,0	g
Aqua dest.	1000,0	ml

pH 7,4

13 g dehydriertes Medium in 1 Liter Aqua dest. aufweichen lassen und sterilisieren (15 Min. bei + 120° C).

Listeria-Transport-Anreicherungs-(LTA-)Medium

(Modifiziertes STUART-Medium mit Zusatz von Nalidixinsäure und Acridinfarbstoffen.)

STUART-Medium (siehe oben) mit Nalidixinsäure (40 µg/ml) 15 Min. bei + 120° C autoklavieren. Anschließend Acridinfarbstoff (10 µg/ml) (Acriflavin neutral, Proflavinhemisulfat oder Xanthacridinumhydrochlorid) als wässrige Stammlösung dem Grundgemisch zugeben und gut durchmischen.

Herrn Professor Dr. med. H.P.R. Seeliger danke ich sehr für die Überlassung des Themas, sowie für seine hilfreiche und freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.
Außerdem gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. med. J. Bockemühl sowie allen Institutsangehörigen, vor allem im Listerioselabor, die mir bei allen praktischen Arbeiten sehr geholfen haben.

L e b e n s l a u f

Am 27. Juni 1936 wurde ich als Sohn des Textilkaufmanns Martin Feindt und seiner Ehefrau Maria, geb. Arnold, in Krefeld geboren.

Von 1943 bis 1946 besuchte ich die Volksschule in Zittau in Sachsen, wohin ich während dieser Zeit evakuiert war. In Krefeld setzte ich den Schulbesuch von 1947 bis 1948 fort und absolvierte anschließend das Städt. Arndt-Gymnasium in Krefeld bis Ostern 1954. Die folgenden zwei Jahre machte ich eine textiltechnische Ausbildung an einer Ingenieurschule mit und kehrte nach deren Abschluß Ostern 1956 auf das Arndt-Gymnasium zurück, wo ich 1959 die Reifeprüfung ablegte.

Bis zu Beginn des Medizinstudiums 1963/64 an der Universität Würzburg war ich kaufmännisch-technisch in der Textilbranche tätig.

1965 legte ich in Würzburg die Naturwissenschaftliche Vorprüfung und 1967 die Ärztliche Vorprüfung ab.
Am 13. August 1970 bestand ich das Medizinische Staatsexamen an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Meine Medizinalassistentenzeit leistete ich an der hiesigen Medizinischen Universitätsklinik, im Institut für Hygiene und Mikrobiologie Würzburg und in der chirurgischen Abteilung des Städt. Krankenhauses Wertheim ab.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die Dissertation selbständig angefertigt, dabei keine anderen Hilfsmittel als die im Quellen- und Literaturverzeichnis und in den Anmerkungen genannten benutzt, alle aus Quellen- und Literaturverzeichnis ganz oder annähernd entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht und einzeln auch die Fundstellen nachgewiesen habe.

Würzburg, den 12. Juni 1972 Edgar Feindt

Schnelldruck-Böhler, 87 Würzburg, Seilerstr. 10

Schnelldruck-Böhler, 87 Würzburg, Seilerstr. 10